

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Ekologie a ochrana prostředí

Ochrana životního prostředí



Assel KUANYSHEVA

SCREENING SCHOPNOSTI HLUBINNÉ MIKROFLÓRY ROZKLÁDAT ROPNÉ LÁTKY

SCREENING OF POSSIBILITIES OF DEEP SUBSURFACE MICROFLORA TO DECOMPOSE SELECTED ORGANIC COMPOUNDS

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Mgr. Ing. Jan Frouz, CSc.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 29. 4. 2013

.....

podpis

Poděkování

V souladu s všeobecně přijímanými tradicemi začíná i moje práce poděkováním. Svě díky však neomezují jen na toto prohlášení, jelikož je celá práce zároveň věnovaná jednotlivcům, kteří se podělili o své znalosti, zkušenosti a laskavosti, a kteří mě v mnoha ohledech podporovali na této dlouhé cestě. Vyjadřuji své zvláštní poděkování vedoucímu mé diplomové práce, doc. Mgr. Ing. Jan Frouzovi za jeho vedení, povzbuzování a příležitost získat vysokoškolské vzdělání na Karlově Univerzitě. Tato práce vznikla a byla zformulována za pomoci jeho vyjimečných návrhů a dobrých rad.

Důležitou roli při vzniku práce hrála vedoucí oddělení Akademie Věd České Republiky v Českých Budějovicích Alica Chroňáková. Jí bych ráda vyjádřila svou vděčnost za prokázanou trpělivost, školení a poskytnutí příležitosti k práci v laboratoři, za její laskavost a rady. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Jiří Petraskovi za přátelskou atmosféru a pomoc při výkonu experimentů v laboratoři.

Svou vděčnost chci také vyjádřit mému příteli a kolegovi Jakubovi Zelenému, který mi ochotně pomohl s úpravou textu po stránce jazykové.

Ještě ráda bych poděkovala své rodině za jejich neocenitelnou podporu.

Screening schopnosti hlubinné mikroflóry rozkládat ropné látky

Abstrakt

Cílem práce bylo otestovat bakteriální kmeny hlubinné mikroflóry na jejich schopnost růst na naftě jako příkladu alifatických ropných látek a na toluenu jako příkladu aromatických ropných látek, dále optimalizovat kultivaci vybraného kmene, otestovat jeho růst a mikrobiální aktivitu vybraných kmenů v podmínkách simulujících půdní poměry; posoudit využitelnost těchto kmenů v praktických remediacích kontaminace ropnými látkami.

Předložena diplomová práce se zabývá zhodnocením možnosti využití vybraných kmenů hlubinné mikroflóry pro rozklad ropy. Je známo, že některé skupiny mikroorganismů, žijících v třetihorních jílovcích v hloubkách 30-450 m pod povrchem země jsou schopny rozkládat fosilní organickou hmotu typu kerogenu. Chemické nálezy přitom ukazují, že tato organická hmota se sestává z různě dlouhých alifatických řetězců a je tedy předpoklad že mikroorganismy rozkládající kerogen by mohli být schopni rozkládat i ropu a ropné produkty.

Z výsledků našeho experimentu můžeme usuzovat, že benzen a toluen, stejně jako kerogen představují velmi odolné organické sloučeniny a důkazy o jejich mikrobiální degradaci jsou vzácné. Utilizace nafty jako zástupce alifatických látek je lepší než utilizace toluenu jako zástupce aromatických látek. Metabolická aktivita sledovaných kmenů je příliš pomalá pro použití v biodegradační praxi, ale hodí se na bioremediace odpadu.

Klíčové slova: biodegradace, ropné látky, hlubinná mikroflóra.

Screening of possibilities of deep subsurface microflora to decompose selected organic compounds

Abstract

The aim of the study is to test the deep microflora bacterial strains for their ability to grow in oily environment, aliphatic hydrocarbons and toluene were taken as examples of aromatic hydrocarbons and where the cultivation of selected strain, were produced for testing its growth and microbial activity of selected strains in conditions simulating soil conditions; assess the usability these strains in practical remediation of contamination by oil.

This thesis deals with the evaluation of possible use of selected strains of deep microflora for oil decomposition. It is evident, that some groups of microorganisms living in the Tertiary claystones at depths of 30-450 m below the surface are the biodegradable fossil organic matter type of kerogen. Chemical findings indicate that, this organic matter consists of various lengths of aliphatic chains, and thus the assumption that microorganisms decomposing kerogen might be able to disassemble oil and petroleum products.

The findings of our experiment indicate that benzene and toluene, as well as kerogen are highly resistant to organic compounds and evidence of microbial degradation are rare. Utilization of oil as representative aliphatic compounds is better than the utilization of toluene as a representative of aromatic compounds. Metabolic activity observed strains is too slow for use in bioremediation practice but fits the bioremediation of waste.

Keywords: biodegradation, organic compounds, deep microflora

OBSAH

Seznam použitých symbolů a zkratk.....	7
Seznam tabulek.....	8
Seznam obrázku.....	9
1. Úvod.....	12
2. Literární přehled.....	15
2.1. Ropné látky.....	14
2.2. Význam ropných látek v životním prostředí.....	15
2.3. Mikrobiální degradace ropných látek.....	18
2.3.1. Biodegradace.....	18
2.3.2. Mikrobiální degradace ropných látek.....	18
2.3.3. Předpoklady biodegradace.....	19
2.3.4. Dekompozice ropných látek mikroorganismy.....	21
2.4. Technologie dekompozice ropných látek.....	23
2.4.1. <i>In situ</i> bioremediace ropných látek.....	24
2.5. Podpovrchová mikroflóra.....	26
3. Cíle práce.....	30
4. Metodika.....	31
4.1. Použité chemikálie, biologický materiál, testované vzorky.....	31
4.1.1. Používané látky.....	31
4.1.2. Příprava media.....	31
4.1.3. Biologický materiál.....	32
4.1.4. Charakteristika testovaných vzorků.....	32
4.1.5. Příprava inokula.....	33
4.2. Růst a respirace bakteriálních kultur na naftě a toluenu.....	36
4.2.1. Stanovení bazální respirace pudy titrační metodou.....	37
4.2.2. Epifluorescenční mikroskopie – DAPI.....	38
4.2.3. Délka mycelia.....	39
4.2.4. Výpočet jednotek tvořících kolonie (CFU)	39
4.3. Výběr kmene s nejlepšími schopnostmi růst na organických uhlovodících.....	39
4.3.1. Optimalizace kultivace.....	40
4.4. Statistické hodnocení výsledků.....	41
5. Výsledky.....	42
5.1. Výběr kmene s nejlepšími růstovými schopnostmi.....	42
5.2. Hodnocení růstu kmene M9-2006 a mineralizace různých substrátů.....	43
5.2.1. Délka mycelia.....	43
5.2.2. Stanovení počtu buněk pomocí epifluorescenčního mikroskopu	

	<i>barvením DAPI</i>	45
	5.2.3. Stanovení počtu jednotek tvořících kolonie (CFU)	46
	5.2.4. Respirační testy, zjišťování mineralizace	47
6.	Diskuze.....	49
7.	Závěr.....	52
	Přehled literatury.....	53

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

GM	growth medium - růstový medium
R2A	reasoner's 2A agar – růstový agar
TSB	tryptic Soy Broth – agar se sojovým extraktem
PTFE	polytetrafluorethylene membrane filter – polytetrafluoroethylenový filtr
LPT	membrána pro filtr PTFE
ATCC	american type culture collection – americká uložště bakteriálních kmenů
DSM	německá uložště bakteriálních kmenů
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole - fluorescenční barvivo
CFU	colonie forming units - jednotky tvořících kolonie
BTEX	benzen, toluen, ethylbenzen a izomery xylenu
PRB	permeabilní reaktivní bariéry
BBL	tekuté medium
DNA	deoxyribonucleic acid - kyselina deoxyribonukleová (DNA)
SEM	standard errors of mean
ANOVA	Analysis of variance – Analýza rozptylu

SEZNAM TABULEK

Tab.1	Seznam použitých kmenů izolovaných z hlubokých podpovrchových vrstev (30-150 m) miocenních sedimentů (vzorky v otevřené jámě "Držba" u Sokolova, Česká republika)	32
Tab.2	Výsledky naměřených hodnot optické denzity suspenzí testovaných kmenů pomoci provedení kalibrace přístrojem Thermo Scientific.	33
Tab.3	Výsledky naměřených hodnot spotřeby suspenze testovaných kmenů pro potřebu na experiment jako přídavku do laboratorní lahvi.	34
Tab.4	Experimentální návrh práce, při kterém byl pozorován vliv zdroje uhlíku a jeho koncentrace na kultivaci inokula různých testovaných kmenů a jeho růst během pokusu.	40

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr.1** Kalibrace naměřených hodnot optické denzity suspenze testovaných kmenu při vlnové délce A 600. 33
- Obr.2** Kmen *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group), který ukázal největší životaschopnost při růstu na substratech s přidavkem organických uhlovodíků, nafty a toluen. 41
- Obr.3** Respirace různých kmenů na písku s minerálním médiem, bez zdrojů uhlíku nebo s glukózou či naftou jako jediným zdrojem uhlíku. 42
- Obr.4** Sloupcový graf průměrných hodnot a SEM (standard errors of mean) délek mycelia kmenu *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s různými přidavky. 43
- Obr.5** Fotografie mycelia kmenu *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s přidavkem glukózy. (10 μ m) 43
- Obr.6** Sloupcový graf průměrných hodnot a SEM (standard errors of mean) počty buněk v 1 ml. vzorku (abundance) suspenze kmene *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s různými přidavky stanovené pomocí barvení DAPI v epifluorescenčním mikroskopu. 45
- Obr.7** Počet CFU v 1 ml suspenzi kmene *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s různými přidavky. 45
- Obr.8** Sloupcový graf průměrných hodnot a SEM (standard errors of mean) výsledku provedené první titrace po 7 dnech v serii s inokula kmene *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s různými přidavky. 46

Obr.9 Sloupcový graf průměrných hodnot a SEM (standard errors of mean) výsledků druhé titrace po 14 dnech v serii s kmene **47**
Streptomyces sp. MIO9-2006 (S. platensis group) pěstovaným na minerálním médiu s různými přísadami.

KAPITOLA 1

Úvod

Ropné produkty jsou hlavním zdroje energie pro průmysl a energetickou spotřebu v každodenním životě. Paliva z ropy poskytují přibližně 40% až 50% z celkové světové spotřeby energie (Cílek a Kašík, 2007). V současnosti poptávka po ropných produktech každým rokem roste spolu se zvyšující lidskou populací (NRC, 2003). V současnosti je ropa dominantním zdrojem energie ve světě a dále se očekává, že zůstane potřebná ještě po několik příštích desetiletí (NRC, 2003, Wang a Brown, 2008).

Znečištění půdy ropou a ropnými látkami v průmyslových zemích se stala vážným problémem. Rozsah nebezpečnosti na životní prostředí závisí na ploše znečištěné ropnými látkami, jejich chemickém složení, a hloubky, v níž jsou přítomny kontaminanty. (Wolicka a kol., 2009)

Užívání ropy v celém světě přináší řadu environmentálních problémů. Environmentální problémy s využíváním ropy, patří k nim uniky s tankerů a havárie při těžbě ropy a ještě havárie v průběhu přepravy ropy, které dnes je jedním z hlavních problémů spojených se životním prostředím. Přesněji, jedná se o uhlovodíkové kontaminace vyplývající z činností petrochemického průmyslu (Das a Chandran, 2011). Podle údajů (NRC, 2003) není objem úniku ropy na souši znám, nicméně bylo zaznamenáno velké množství znečištění povrchu a podkladů právě důsledkem havárií a úniku ropy ze skladovacích kontejnerů. Podle statistiky uvedeny od společnosti ITOPF v Španělsku v roce 2002 v okrese *Off Galicia* z tankeru *Prestige* uniklo asi 63 000 tun ropných produktů (ITOPF, 2012). Jako příklad ještě většího znečištění můžeme uvést Mexický záliv. V 2010 roce do Mexického zálivu ze zničeného vrtu vychrlilo odhadem 13 milionů litrů ropy (Polochová, 2010). Hlavní zdroje úniku ropy do životního prostředí jsou těžba ropy, její provoz, transport a skladování. Ropné látky jsou považovány za vzpurné k mikrobiální degradaci a přetrvávají v ekosystémech, kvůli jejich hydrofobní povaze

(nízká rozpustnost ve vodě) a nízké volatilitě, a proto představují významnou hrozbu pro životní prostředí (Raeid a kol, 2002). Při ropném znečištění se na hladině vytváří hustá tenká (asi 2 mm) vrstva z ropy a těžkého oleje (Herber, http://www.herber.webz.cz/www_ocean/12-znecisteni.html). Herber (http://www.herber.webz.cz/www_ocean/12-znecisteni.html) ve svých internetových stránkách popisují procesy které nastává po vytvoření vrstvy na hladině vody: „Nejprve dochází k vyprchání lehkých uhlovodíků, ropa ztrácí cca 25 % své hmotnosti, zbývající část se odbourává i fotochemicky, ale většina ropy se postupně mění v těžko odbouratelnou gelovitou hmotu, část emulze z ropných látek klesá ke dnu. Ještě asi po 3 měsících mají plovoucí ropné látky asi 15 % původního objemu“ (Herber, http://www.herber.webz.cz/www_ocean/12-znecisteni.html). Ropa navíc obsahuje řadu uhlovodíkových komponent. Uhlovodíkové komponenty, patří do skupiny karcinogenů a neurotoxických organických znečišťujících látek. V nedávné době uznávané různé metody odstraňování uhlovodíkových nečistot, jako je spalování nebo nebezpečné skládkování, nejsou již v současné době řešením tohoto globálního problému. Skládky a spalování mají mnohé negativní strany; v podstatě je to příliš drahé, když počet znečišťujících látek překračuje obrovské množství. Další způsoby, kterými lze eliminovat hrozbu znečišťování nebo alespoň snížit množství uhlovodíkových produktů z kontaminovaných lokalit, jsou mechanické a chemické metody pomocí, které jsou však méně efektivní a mohou být dokonce dražší než skladovací metody. V novém světě technologického pokroku se stává stále naléhavější najít nejbezpečnější způsob pro odstraňování organických znečišťujících látek z prostředí. Biologické čištění je perspektivní technologií pro čištění kontaminovaných lokalit, je to nákladově efektivní a povede k dokončení mineralizace. Hlavní funkcí bioremediace je biodegradace, která je v konečné fázi zakončena komplexní mineralizací organických látek na oxid uhličitý, vodu, anorganické sloučeniny a buněčné bílkoviny nebo dochází k transformaci komplexních organických znečišťujících látek do jiných jednodušších organických sloučenin pomocí biologických činitelů, jako jsou mikroorganismy (Das a Chandran, 2011).

Při odstranění kontaminantů z půd znečištěných ropnými uhlovodíky se prokazuje využití přirozeného biodegradačního potenciálu některých půdních mikroorganismů. V posledních letech byla uskutečněna celá řada studií potvrzujících působivost půdních mikroorganismů při rozkladu ropných uhlovodíků *in situ* (Hunkeler

a kol, 2002, Gogoi a kol, 2003) taky v experimentálních podmínkách (Das a Mukherjee, 2007, Machín-Ramírez a kol, 2008, Vieira P. a kol, 2007).

Tyto diplomová práce se zabývá posouzením potenciálnosti využití testovaných kmenů hlubinné mikroflóry pro rozklad ropy. Je známo, že některé skupiny mikroorganismů, žijících v třetihorních jílovcích v hloubkách 30-450 m pod povrchem země jsou schopny rozkládat fosilní organickou hmotu typu kerogenu (Frouz a kol, 2011). Chemické nálezy přitom ukazují, že tato organická hmota se sestává z různě dlouhých alifatických řetězců a je tedy předpoklad že mikroorganismy rozkládající kerogen by mohli být schopni rozkládat i ropu a ropné produkty.

Předložená práce je zaměřena na screening schopnosti vybraných bakteriálních kmenů rozkládat ropné látky a dále na kvantifikaci rychlosti dekompozice při různých podmínkách. V případě, získané výsledky by mohly být využity pro praktickou cílené použití těchto kmenů při *in situ* bioremediaci kontaminovaných půd.

KAPITOLA 2

Literární přehled

2.1 Ropné látky

Frankovská a kol. (2010) navrhuje definice ropy jako přírodní tekuté směsi kapalných a rozpustných tuhých uhlovodíků. Obsahuje množství neuhlíkatých, organických sloučenin a minerálních příměsí. Ropa je bezbarvá až černá kapalina, má parafínovou, benzínovou nebo sirnou vůni. (Frankovská a kol. 2010)

Bento a kol. (2005) uvádí, že ropa a její produkty, například motorové nafta, patří k nejčastějším kontaminantům životního prostředí. Některé ropné produkty jsou lehčí než voda, proto mají riziko kumulace v úrovni hladiny podzemní vody. Vzhledem k tomu, že ropa a její produkty jsou z geologického pohledu přírodního původu, a vzniká při anaerobní přeměně biomasy za vysoké teploty a tlaku, a proto snadno procházejí biodegradačním procesům, ale v pomalém tempu. (Cohen, 2002). Ropa představuje směs uhlovodíků, která může obsahovat od nejlehčích frakcí uhlovodíku až po různá množství benzenu, toluenu, xyleny nebo naftalen, a proto vždy záleží na konkrétním složení (Bento a kol. 2005). Podle složení je známá lehčí a těžší (naftenická, aromatická) ropa. Rozdíl mezi lehkou a těžkou ropou ukazuje práce Frankovská a kol. (2010), podle níž je těžká ropa mastnější než lehká. V lehké ropě (průměrná hustota $850 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$) převažují hexany a cyklohexany. V těžké ropě (průměrná hustota $930 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$) je vysoký podíl naftenických a aromatických látek, pryskyřic a dehtu, k tomu ještě arény a různé organické sloučeniny síry a dusíku, které dosahují až 75%. Ropa s nízkým obsahem síry se nazývá sladká ropa, zatímco méně žádoucí ropy s vyšším obsahem síry se nazývají kyselé surové. (Morrison, 2000, Frankovská a kol., 2010)

V práci Wolicka a kol. (2009) ukazují, že „ropa a ropné produkty obsahují mnoho druhů organických sloučenin, dominují alifatické a aromatické uhlovodíky“. Das

a Chandran (2011) v svoje práce specifikovali rozdělení ropných uhlovodíků do čtyř tříd: nasycené mastné kyseliny, aromáty, asphaltenes, fenoly, mastné kyseliny, ketony, estery a porfyrinů) a pryskyřice (pyridiny, chinoliny, carbazoles, sulfoxidy a amidy). Cohen (2002) tvrdí, že pokud dosáhneme příznivých podmínek v životním prostředí, všechny přírodní organické látky se mohou rozložit. Pokud je jakákoli organická sloučenina, která vzniká v ekosféře, sama o sobě resistantní vůči degradaci, bude docházet k její postupné akumulaci. Signifikantní organické usazeniny, jako například fosilní paliva, se hromadí pouze za podmínek nevhodných pro biodegradaci. (Cohen Y, 2002).

Uhlovodíky lze podle jejich rozložitelnosti v závislosti na složení seřadit v následujícím pořadí: n-alkany > rozvětvené alkany > nízkomolekulární aromatické alkany > cyklické alkany (Das a Chandran, 2011).

Výše bylo uvedeno, že benzín obsahuje směsi organických uhlovodíků, zejména monoaromatické uhlovodíky (benzen, toluen, ethylbenzen a izomery xylenu (BTX)), které se vyskytují v znečištěném okolí ropného průmyslu. Tyto organické látky jsou nejen toxické, navíc mají vysokou rozpustnost ve vodě ve srovnání s ostatními alifatickými sloučeninami, které tvoří součást benzínu. V okamžiku, kdy proniká benzín nebo jemu podobné organické uhlovodíky do vody, má rozpustnost ve vodě benzen, toluenu, ethylbenzen, xylenu a benzínu hodnoty dle pořadí 18, 25, 3, 20, 50 až 100 ppm. Dnes existuje obrovská hrozba kontaminace podzemních vod monoaromatickými uhlovodíky, které spadají do vody prostřednictvím úniku benzínu, ropy, nafty a ropných produktů ze skladovacích a odpadních nádrží ropného průmyslu. Rizika kontaminace podzemní vody toxickými látkami je vážným problémem, protože podzemní voda v některých oblastech ve světě se používá jako hlavní zdroj pitné vody (Farhadian a kol, 2008)

2.2 Význam ropných látek v životním prostředí

Dá se říci, že ropné produkty jsou jedním z hlavních zdrojů energie pro průmysl a každodenní život. Kromě toho, ropné látky využívají jako maziva pro stroje a výrobu asfaltu na povrch silnic a střech budov.

Ropa má své užití všude: je surovinou pro mnoho chemických látek, jako jsou plasty, barvy a kosmetiku. Přeprava ropy na celém světě je značná a množství ropných zásob

ve vyspělých zemích je enormní. Riziko vzniku ropných skvrn je v důsledku toho značné. Velká část světových zásob ropy je omezena na konkrétní geografické oblasti, přičemž většina světových zásob ropy se nachází v moři. Kontaminace moře jsou vcelku běžné, stejně jako riziko katastrof a s nimi spojené dopady na životní prostředí. Uhlovodíky v mořském prostředí pocházejí především z antropogenních zdrojů, kterými jsou znečišťující látky ze splašků z nádrží, chronické vypouštění z tankerů a kolizi cisteren (Das a Chandran, 2011).

K odstraňování ropných látek z prostředí dochází řadou mechanismů. Odpařování je důležitý proces zvětvávání při odstraňování ropných kontaminací v půdě i ve vodě. Rychlost odpařování závisí na počasí prostředí; obvykle nízké teploty mají tendenci snižovat míru odpařování, vysoké teploty a vysoké rychlosti větru naopak. Objem skvrny obvykle přesahuje vlastní sanační kapacity pro dané prostředí, což vede k výrazné ekologické zátěži. Typy vzorků bakteriálních kmenů použitých v bioremediaci existují v různých úložištích (např. ATCC, DSM atd.), nebo jsou komerčně dostupné a jsou obvykle zahrnuty v rámci patentových práv. Každý z těchto kmenů může produkovat působivé výsledky in vitro pro specifické cílové sloučeniny. Nicméně, je omezen celkový úspěch těchto kmenů na ošetření široké škály kontaminantů in-situ. Znovu zavedení původních mikroorganismů, izolovaných z kontaminovaného oblasti, se mohou být velmi účinnou metodou bioremediace, zejména pokud růst mikroorganismů doplněn o kyslík a hnojiva. (Cohen Y, 2002)

V současnosti jsou častými případy ohrožení ropou lokální znečištění půdy při těžbě a havárie v průběhu její přepravy (mezi největší patří např. havárie tankeru Exxon Valdez u břehů Aljašky v roce 1989 a havárie tankeru Prestige u břehů Španělska v roce 2003). (Frankovská a kol, 2010)

Podle zahraničních norem kritického znečištění ropou půdního prostředí je půda kontaminovaná tehdy, pokud obsahuje 500 mg.kg^{-1} , a vyžaduje sanace, pokud je v 1 kg půdy více než 1 g ropy. V publikaci Frankovská a kol. (2010) podrobně popisuje zhoršení vlastností půdy při znečištění ropou: fyzikálních, chemických a biologických vlastností půdy. Změny zhoršení nastávají v fyzikálních vlastnosti půdy, tím že snižuje vypařování vody a zvyšuje hydrofobnost půdních agregátů, v důsledku zvýšení hydrofobnosti vzniká mastný film na povrchu půdy, která se omezuje cirkulace vzduchu mezi půdou a atmosférou. Půdní částičky se obalují ropou, která klade odpor při "dýchání" půdy, tj. úniku CO_2 z půdy do ovzduší. Voda do půdy se hůře vsakuje. Kořeny přijímají vodu z půdy obtížněji a rostliny trpí suchem. Chemické vlastnosti se

mění tak, že pozoruje se zvýšení alkalizace a snížení dostupnosti živin (zejména P a K) pro rostliny. V důsledku vlivu volného sodíku, který je v obsahu ropy nastavá změny v alkalizace půdy, tím že peptizuje půdní agregáty. V důsledku účinků aromatických uhlovodíků přítomných v ropě, zejména minerálních mazadel reakce slabě kyselé půdy ($\text{pH} = 5$) se mění na alkalickou ($\text{pH} = 8$). Nejvýrazněji se však projevuje zhoršení biologických vlastností půdy. Při dosažení obsahu ropy $0,7 - 50 \text{ ml. kg}^{-1}$ půdy (asi $0,6 - 40 \text{ mg. kg}^{-1}$) už mění druhové složení společenstva mikroorganismů. Zvyšuje se zastoupení druhů z rodu *Penicillium* a *Mortierella* na úkor druhů z rodu *Streptomyces*, *Mucor* a jiných. Objevují se nové druhy *Aspergillus ustus* a *Penicillium tardum* při dosažení koncentrace ropy v půdě $50 - 300 \text{ ml. kg}^{-1}$ (asi $40 - 270 \text{ mg. kg}^{-1}$) jsou jedinými představiteli mikroorganismů v půdě. Jestli obsah ropy v půdě bude vyšší než 300 ml. kg^{-1} (více než 270 mg. kg^{-1}), to znamená totální úmrtnost všech mikroskopických organismů v půdě a půda vyžaduje radikální sanaci. Kromě mikroskopického druhu v půdě existuje ještě negativní vliv přítomnosti ropných látek na vyšší skupiny představiteli půdy: na půdní makrofaunu už 10 ml. kg^{-1} půdy, 20 ml. kg^{-1} ničí všechny druhy fauny, pro kořeny rostlin je toxický obsah ropy vyšší než 50 ml. kg^{-1} . (Frankovská a kol, 2010)

Toxičtěji než ropa působí na biotu některé její komponenty. Benzín svými výpary ničí mikroorganismy již v množství $<1 \text{ mg. kg}^{-1}$. Po poškození benzínových čerpadel po neopatrném čerpání pohonných hmot nebo po havárii motorových vozidel se může vyskytnout značná intoxikace okolních půd. V takovém případě se vypěstována produkce nedá konzumovat pro nepříjemný pach a nepříjemnou příchut'. (Frankovská a kol, 2010). V případě znečištění ropné, ropa může způsobit přímé nebo nepřímé účinky na ryby a jiné živočichy: při rozpuštění složek ropy a rafinovaných produktů ve vodě působí toxické pro býložravce v potravinářském řetězci.

Avšak, je nutné poznamenat, že v rozvojových a malo rozvinutých zemí počet kontaminovaných lokalit je mnohem méně, ale jakmile země začínají vyvíjet v průmyslovém sektoru, zdá se pravděpodobné, že nebudou moci využít úspěšné zkušenosti z více industrializovaných zemí, což ukazuje tendence, že kontaminované půdy se stává nevyhnutelným důsledkem vývoje zemi. Vzhledem k zvýšení počtu takových zemí s znečištěním zatěží, je potřeba pro výzkum a vývoj do nakladů efektivní sanace. (Atlas, 1981)

2.3 Mikrobiální degradace ropných látek

2.3.1 Biodegradace

Mikrobiální degradace hraje důležitou roli v procesu zvětrávání. Biodegradace ropy v přírodních ekosystémech je složitý proces, trvá nemálo času (Atlas, 1981). Obvykle je známo, že termín biodegradace používán ve spojení s ekologií, ale je dostatečné studie, ve kterém má spojení s odpadovým hospodářstvím (Shah a kol, 2008) a bioremediací. Biodegradace, nebo biologický rozklad, je speciálním případem degradace, při kterém dochází k rozkladu ropné látek působením biologických činitelů, přesněji enzymatickým působením živých organismů (Shah a kol, 2008). Tento proces může v konečné fázi vést ke komplexní mineralizaci organických látek na oxid uhličitý, vodu, anorganické sloučeniny a buněčné bílkoviny, nebo transformovat komplexní organické znečišťující látky do jiných jednodušších organických sloučenin pomocí biologických činitelů, jako jsou mikroorganismy (Das a Chandran, 2011).

Biodegradace ropných uhlovodíků závisí na povaze a na množství uhlovodíků přítomných na znečištěném prostředí (Das a Chandran, 2011).

2.3.2 Mikrobiální degradace ropných látek

Claude a Zobell (1946) byli jedněmi z prvních badatelů, kteří zhodnotili účinnost mikroorganismů při rozkladu uhlovodíků. Zjistili, že mnohé mikroorganismy mají schopnost využívat uhlovodíky jako jediné zdroje energie uhlíku a že tyto mikroorganismy jsou široce rozšířené v přírodě a dále, že mikrobiální využívání uhlovodíků je kromě environmentálních faktorů velmi závislé na chemické povaze látek v rámci ropné směsi (Atlas, 1981).

Různé mikroorganismy rozkládají různé typy uhlovodíkových sloučenin a vyžadují k přežití různé životní podmínky (Das a Chandran, 2011). Základním principem biologické degradace je růst mikroorganismů a zvýšení velikosti mikrobiálních populací vytvořením optimálních podmínek prostředí. Raeid a kol. (2002) pokusili zkoumat schopnosti původních společenstev v sedimentech lokality Wadi Gaze při degradaci modelové sloučeniny (n-octadecane, pristane, fenantren, a dibenzothiophene) v laboratorních podmínkách, a k tomu ještě sledovali změny v mikrobiálním společenství v průběhu expozice těmito sloučeninám. Tyto sloučeniny,

které byly v průběhu výzkumu izolovány, představují nejvýznamnější ropné složky (přímé řetězce alkanů, rozvětvené alkany, aromatické uhlovodíky, a sloučeniny organosulfur), které byly nalezeny v sedimentech Wadi Gaze. Obecně platí, že alkany a polycyklické aromatické uhlovodíky jsou v znečištěných oblastech životního prostředí všudypřítomné. Zvláštní pozornost byla věnována polycyklickým aromatickým uhlovodíkům, neboť vykazují toxické, mutagenní a karcinogenní vlastnosti. Výsledkem jejich práce bylo zjištění, že mikrobiální společenstva obývající Wadi Gaza účinně degradovaly jak alifatické sloučeniny (pristane a n-octadecane), tak aromatické sloučeniny (fenantren a dibenzothiophene). Nicméně, je nutné izolovat klíčové mikroorganismy, abychom mohli plně využít jejich individuální potenciál při degradaci různých ropných sloučenin. (Raeid a kol, 2002)

Biodegradace ropných produktů může být důsledkem samotného působení mikroorganismů, avšak častěji jde o kombinaci více degradačních procesů. V studii Gu (2003) zkoumají proces biodegradace polymerů. Mikroorganismy užívané při biodegradaci složitých polymerů (Gu, 2003), a v bioremediaci mastných odpadů (Hart, 1996) produkuje exoenzymy, které rozštěpí na krátké řetězy nebo zredukovatelné molekuly. Dále tyto menší molekuly snadno může projít přes polopropustné vnější membrány bakterií, a pak být využitým jako zdroj uhlíku a energie. Předpokládáme, že tyto enzymy mikroorganismu od těchto procesu biodegradace, taky rozrušuje uhlovodíkové molekuly, tudíž je vhodný pro sanace ropných látek (Hart, 1996).

Základním krokem degradačního procesu všech složitých organických sloučenin je redukce molekulové hmotnosti, která je současně limitujícím faktorem biodegradace ropných látek. Obecně, čím vyšší je molekulová hmotnost ropné látky, tím se biologická rozložitelnost přítomnosti mikroorganismů snižuje. Vysoká molekulová hmotnost totiž vede k výraznému poklesu rozpustnosti, což snižuje možnost napadení mikroorganismy (Gu, 2003).

2.3.3 Předpoklady biodegradace

Četné vědecké práce se zabývají faktory, které ovlivňují průběh a rychlost biologického rozkladu ropných látek (Das a Chandran, 2011).

K tomu, aby se uskutečnila biodegradace ropné látek v kontaminovaném prostředí, musí být splněny určité předpoklady, za kterých dojde k transformaci či mineralizaci organické látky:

- musí existovat mikroorganism, který produkuje vhodné enzymy pro uskutečnění určité cílené biodegradace.
- vybavený takovým to metabolickou funkcí mikroorganismus musí být přítomný v kontaminovaném prostředí, kde se ropné látky nachází
- musí být **ropné uhlovodíky** dostupny pro mikroorganismy. (Horáková, 2006).

Můžeme tedy shrnout, že pokud jsou splněny výše uvedené předpoklady, pak optimální tempo růstu mikroorganismů a proces biodegradace ropných uhlovodíků lze udržet tím, že se zajistí **odpovídající koncentrace živin a kyslíku, a pH** se pohybuje mezi 6 a 9. (Das a Chandran, 2011).

Faktory, které mají vliv na mechanismus degradace, včetně ovlivnění na rychlost růstu mikroorganismů a jeho enzymatickou činnost, také ovlivňují i rychlost biodegradace ropy. Patří mezi ně fyzický stav ropy, abiotické faktory půdy: teplota a pH, kyslíková bilance, salinita, a dostupnost živin. (Gu, 2003).

Mezi fyzikální faktory, které hrají důležitou roli při biodegradaci uhlovodíků patří teplota, která přímo ovlivňuje chemii znečišťujících látek, jakož i vliv na fyziologii a různorodost mikrobiální flóry. V práci Das a Chandran (2011) byly diskutovány podrobně o stanovené limitující faktory, které mají vliv na biodegradaci ropných uhlovodíků. Atlas (1981) se zjistil, že při nízkých teplotách se viskozita ropných látek zvyšuje, zatímco volatilita toxických nízkomolekulárních uhlovodíků se snižuje a nastává tak oddálení nástupu biologického rozkladu.

Teplota také ovlivňuje rozpustnost uhlovodíků. Ačkoli k biodegradaci uhlovodíků může dojít v širokém rozsahu teplot, rychlost biodegradace obvykle klesá se snižující se teplotou. Nejvyšší rychlost biodegradace ropných uhlovodíků se obvykle nachází v rozmezí 30-40°C v půdních prostředích, 20-30°C v některých sladkovodních prostředích a 15-20°C v mořském prostředí. Venosa and Zhu uvádí, že teplota prostředí ovlivňuje jak vlastnosti uniklé ropy, tak i činnost mikroorganismů (Das a Chandran, 2011).

Tedy, jestliže ropné látky odolávají biodegradaci, a nejsou splněny některé z výše uvedených předpokladů nebo neexistuje mikroorganismus s dostatečnou degradační kapacitou, probíhá degradace velmi pomalu (Horáková, 2006). Proto musíme rozhodnout vhodný sanační přístup pro cílené kontaminované lokalitu. Důležitým faktorem pro posouzení vhodnosti sanačního přístupu je také složení a biologická rozložitelnost znečišťujících ropných uhlovodíků (Das a Chandran, 2011).

2.3.4 Dekompozice ropných látek mikroorganismy

V názvu diplomové práce je definován předmět zájmu: ropné látky jakožto substrát pro mikrobiální populace, jinými slovy jako zdroj uhlíku a energie pro jejich fyziologické a metabolické projevy. Mikroorganismy, které jsou schopné využívat ropné látky jako substrát, lze následně chápat jako potenciální biotechnologický nástroj pro řešení problémů spojených s kontaminací životního prostředí. (Mikeš, www.epssro.cz).

Proč především ropu a její produkty používáme jako substrát pro mikroorganismy? V práci Mikeše (www.epssro.cz) se uvádí odpověď ve smyslu, že tyto látky v rámci svého mikrobiálního metabolismu představují zdroj uhlíku a energie pro růst. Jinými slovy, slouží jako zdroj (donor) elektronů, tedy jsou příkladem sloučenin s nižším oxidačním číslem a jejich oxidací se elektrony přesouvají na vhodné akceptory elektronů (např. kyslík, sírany, dusičnany). Uvedený tok elektronů je hnací silou energetického metabolismu buněk mikroorganismů disponujících tyto schopnostmi. Důležitým znalostem je jejich strukturální podobnost s tuky (lipidy) a jinými přirozenými nepolárními látkami, vůči kterým si celá řada mikroorganismů v evolučním průběhu vytvořila vhodné enzymové nástroje, které jim umožňují zpracovávat tyto látky jako živinu (Mikeš, www.epssro.cz).

Autoři Fingerman a Nagabhushanam (2005) v svojí knize povídají, že pomocí skupin mikroorganismů *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* dobře degradovatelné jsou nasycené uhlovodíky a lehké aromatické uhlovodíky. Kromě těchto výsledků studie o biodegradaci organických uhlovodíků byla v práci Mikeš (www.epssro.cz) navíc demonstrována degradace nasycených n-alkanů, včetně n-alkanů i s řetězcem delšími než C44, které jsou nejsnáze odbouratelnými sloučeninami. Podle údajů organizace National Academy of Sciences (1985), nejsnáze podléhají degradaci nasycené n-alkany v rozpětí C10-C26. V práci organizace National Academy of Sciences (1985), který zabývá otázkou toxicity ropy a jeho produktů, uvádí: „Hlavní mechanismus degradace n-alkanů spočívá v oxidaci, která odpovídá oxidaci aldehydů, alkoholů nebo funkčních skupin mastné kyselin. Rozvětvené alkany v důsledku sterického efektu odolávají ataku mikroorganismu, však nejsou vůči němu dokonce stálý“. Autory Das a Mukherjee (2007) bylo zjištěno, že mikroorganismy kmene *Acinetobacter sp.* nacházející se v oblasti severovýchodní Indie v ropou kontaminované půdě, mohou využívat n-alkany o délce řetězce C10-C40 jako jediný zdroj uhlíku.

Nicméně, na degradaci ropných látek se podílí více než 100 druhů mikroorganismů, k nimž patří rody *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter* a další. Rychlost odbourávání může být výrazně zvýšena přidavkem detergentů. Většina organismů odbourávajících ropné uhlovodíky si sama produkuje bioemulsifikátory (*Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*). (Fingerman a Nagabhushanam, 2005).

Enzymatické vybavení pro přeměnu ropných látek v rámci mikrobiálního metabolismu lze nalézt u bakterií, taky u eukaryotních mikroorganismů (kvasinky, houby). Podle práce Mikeš (www.epssro.cz) jsou nejčastější bakterie degradující ropné produkty a schopnými využívat v rámci svého metabolismu ropu zástupci rodu *Pseudomonas* a *Burkholderia*. Však dále existuje celá řada dalších bakterií, které dobře pracují s transformací petrochemických produktů. Docela zajímavým zjištěním byl fakt, že dominantním taxonem v oblastech trvalé expozice ropného prostředí nejsou bakterie, ale tzv. lipofilní kvasinky. Velmi známým zástupcem je *Yarrowia lipolytica*, nicméně existují i další kmeny, např. zástupci rodů *Rhodotorula* a *Debaryomyces*. (Mikeš, www.epssro.cz).

Je všeobecně známo, že uhlovodíky v životní prostředí převážně degradují pomocí bakterií, kvasinek a plísní. Příkladem vhodných kmenů pro použití v bioremediaci jsou *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* a *Mycobacterium*, které byly izolovány z ropou kontaminované půdy. Ale mnoho výzkumníků uvedlo, že smíšená populace mikroorganismů se širokou řadou enzymatických schopností, má větší úspěch rozkládat složité směsi uhlovodíků jako je ropa v půdě, ve sladkovodním nebo mořském prostředí.

Ačkoli jsou řasy a prvoci důležitými členy mikrobiální komunity jak ve vodních, tak v terestrických ekosystémech, jejich vztah k biologické degradaci uhlovodíků zůstává neprobádaný. Walker et al. izolovali řasy kmene *Prototheca zopfii*, které byly schopny využívat ropu a smíšený uhlovodíkový substrát a rozsáhle degradovat n-alkany a isoalkany i aromatické uhlovodíky. Cerniglia et al. pozorovali, že devět druhů sinic, pět zelených řas, jedna červená řasa, jedna hnědá řasa a dvě rozsivky mohly oxidovat naftalen. Naproti tomu u prvoků nebyla prokázána schopnost utilizace uhlovodíků pro svůj růst. (Das a Chandran, 2011).

Stackebrandt a kol. (1993) se domnívají, že znalost bakteriální diverzity přírodního prostředí by mohla být prvním krokem k pochopení role a významu bakterií v daném ekosystému. V posledních letech se mnoho provedených studií v oblasti

mikrobiální ekologie, orientovaných především na přírodní nebo kultivované půdy (Borneman a kol, 1996), přiklonilo k užití diverzity bakterií při remediaci znečištěného prostředí a obnovení přirozeného fungování systémů. (Lloydjones a Lau, 1998).

Pro kontaminované půdy, například ropnými látkami, by bylo výhodné na začátku bioremediace určit biodegradační kapacitu testovaného místa a třeba určit vztah k rozsahu a rozmanitosti přirozených mikroorganismů přítomných v půdě. Aby bylo možné vztáhnout přítomnost konkrétních mikroorganismů k požadované funkci, musíme stanovit mikrobiální strukturně-funkční vztahy uvedených účinných konsorcií v půdě (Riis a kol, 2003). Studium jednotlivých izolátů odhalilo důležité znalosti o metabolickém chování jednotlivých mikroorganismů (Pelz a kol, 1999), k čemuž přispívají závěry o mikrobiálních interakcích v rámci experimentů zahrnujících komunity a potravní sítě. Možnost a schopnost prakticky izolovat mikroorganismy, které žijí v kontaminovaném prostředí je často omezena jejich praktickou kultivovatelností. Tento faktor může komplikovat a omezit hodnocení mikrobiální diverzity, když nebudou existovat vhodné kultivační médií. (Pelz a kol, 1999)

2.4 Technologie dekompozice ropných látek

Das a Chandran (2011) definovali proces bioremediace jako využití pomoci mikroorganismů při detoxikaci nebo odstranění znečišťujících látek v důsledku jejich různých metabolických funkcí. Jedná se o rozvíjející se metodu znečišťujících látek včetně produktů z petrolejářského průmyslu. Vyjma toho bioremediace nabízí ekonomicky výhodnou alternativu k fyzikálním způsobem odstranění a následnou likvidaci znečištěných materiálů a je teď známo, jako je metoda biologickým způsobem degradující aromatické a alifatické uhlovodíků (Braddock a kol, 1999). Jak bylo výše řečeno, ropa a její produkty mohou sloužit v podobě zdroji uhlíku a energie pro mikrobiální růst mikroorganismů. (Meyer a kol, 1999). Proto díky znalosti tohoto faktu můžeme říct, že biologickým rozkladem ropných produktů pomocí přírodních populací mikroorganismů mohou být tyto látky odstraněny z životního prostředí, a že je tato metoda levnější než jiné sanační technologie.(Das a Chandran, 2011). V předchozí studii už bylo dosaženo dobrých výsledků použitím bioremediační techniky k řešení problémů s chemikáliemi spojenými s pesticidy (Ou a kol, 2001), těžkými kovy (Ellis a kol, 2003), s chemickými rozpouštědly jako např. phenol (Gonzalez a kol, 2001, Whiteley a Bailey, 2000) a s petrochemickými surovinami (Li a kol, 2000).

V práci Atlas (1995) považují bioremediace za *in situ* procesu a jako takový je vhodnější na *ex situ* ošetření. *In-situ* bioremediace, lze proto považovat za spravované rozšíření toho, co mikroorganismy dělali po milióny let, pomocí složitých uhlovodíků z prostředí použit ve svém metabolismu jako energetický substrát a zdroje (Liu a kol, 2001).

2.4.1 In situ bioremediace ropných uhlovodíků

Jak známo, odstranění organických polutantů z podzemních vod nebo z kontaminované půdy se uskutečňuje pomocí různých chemických (chemické oxidace atd.), fyzikálních (*electro-remediacce*, *air sparging*, *carbon adsorpce*, *filtrace*, *adsorpce pomoci zeolitů*) a biologických metod (bioremediace, biodegradace v reaktoru, fytoremediace atd.). Tyto metody můžeme celkově rozdělit na *in situ* a *ex situ* sanační technologie (Farhadian a kol, 2008). *In situ* a *ex situ* bioremediace jsou efektivní metody sanace při znečištění organickými polutanty podzemní vody a půdy. (Wolfgang a kol, 1995)

Principem *in situ* remediacce je ošetření kontaminovaného materiálu na místě. Při biologickém procesu *in situ* mikroorganismy metabolizují organické kontaminanty na anorganické materiály, jako jsou oxid uhličitý, metan, voda a anorganické soli, a to buď v přírodních, nebo v uměle vytvořených podmínkách (Farhadian a kol, 2008). *In situ* bioremediace je známá jako dlouhodobá technologie obnovy, protože nemáme jistotu o rovnoměrnosti procesu biodegradace kvůli variabilitě vlastností půdy a vodního prostředí. Nicméně, tento proces má své výhody, jako je relativní jednoduchost, nízké náklady a potenciální účinnost při odstranění kontaminace. Naproti tomu, technologie bioremediace *ex situ* je velmi nákladná a obtížná vzhledem k extrakci kontaminované vody nebo půdy z podloží a jejich ošetření. (Farhadian a kol, 2008). Studie, které se zabývají technologiemi bioremediace *in situ*, považují ji za ekologické a finančně únosné řešení, protože umožňuje obejít problémy s přepravou, extrakcí atd. ropných uhlovodíků. (Hunkeler a kol, 1999). Tento fakt přivedl mnohé badatele k zájmu o *in situ* bioremediace kontaminovaných území znečištěných ropnými látkami (Farhadian a kol, 2008).

Kalin (2004) vypovídá o existenci dvou přístupů k *in situ* bioremediacím: i) využití potenciálu účinných mikroorganismů *in vitro*, nebo ii) použití a navýšení přirozeného biodegradačního potenciálu přirozeného mikrobiálního prostředí v technologiích, jako *bio-sparging*, *bio-slurping* a přírodní atenuace. Nicméně, je nutné si

uvědomit, že existují faktory ovlivňující průběh *in situ* bioremediace na kontaminované lokalitě. Jedním z faktorů, popsáných ve studii Farhadian a kol. (2008), je vlastnosti znečišťující látky (zdroje, chemické složení, a toxicita kontaminace, koncentrace, rozpustnost, adsorpce, disperze a volatilita znečišťující látky), faktory prostředí (chemické složení, fyzikální a mikrobiologická charakteristika podzemních vod, chemické a mechanické vlastnosti půdy v kontaminovaném místě, hydrogeologie a hydrologie kontaminované lokality), biologická rozložitelnost kontaminantů, a přítomnost příslušné biologicky aktivní populace mikroorganismů (Farhadian a kol, 2008)

Hodnocení účinnosti bioremediace v kontaminované oblasti je mnohem obtížnější, než v laboratorních podmínkách. Jedním z problémů je nerovnoměrné rozložení znečišťujících látek, které vyžaduje shromažďování většího počtu vzorků za účelem získání statisticky významných výsledků. V půdě se mikroorganismy často vyskytují v rámci konsorcií zahrnujících několik druhů, které jsou v potravním a prostorovém vztahu. Tato skutečnost často brání získat čistou kulturu z bakteriálních komunit, odpovědných za biodegradaci ropných produktů. (Wolicka a kol, 2009). V této souvislosti byly ve výzkumu Wolicka a kol. (2009) získána společenstva uznaná pouze na úrovni rodu. Většina kultury patřilo do rodu *Pseudomonas*, které ukázaly odolnost proti vysokým koncentracím cyklických aromatických uhlovodíků.

V ropou kontaminovaném prostředí obvykle již existují mikroorganismy schopny mineralizovat ropný polutanty. Úkolem *in situ* bioremediace je stimulovat jejich mikrobiální metabolismy pomocí extérní dodávky oxidantů (O_2 , H_2O_2 nebo NO_3^-) a živin (N, P). (Hunkeler a kol, 1999). V publikaci Farhadian a kol. (2008) je popsána řada úspěšných výsledků aplikace *in situ* bioremediace na podzemních vodách při odstraňování monoaromatických uhlovodíků (benzen, toluen, ethylbenzen a směs xylenů (BTEX)). Pomocí bioremediační techniky se podařilo dosáhnout alespoň snížení obsahu monoaromatických sloučenin v kontaminované vodě až na úroveň standardní normy pitné vody (Farhadian a kol, 2008). V studii Wolicka a kol. (2009) figurují čtyři společenstva mikroorganismů (kmen *Psychrophilous*, *Pseudomonas*), které byly použity v *in situ* bioremediaci na lokalitě kontaminované ropnými produkty. Ve většině ostatních studií, které měly úspěch s *in situ* bioremediací BTEX kontaminantů, byl zaznamenán vyšší podíl užitých společenství mikroorganismů kmene *Mesophilous*. (Wolicka a kol, 2009)

Před zahájením procesu biodegradace v cílené oblasti, je třeba předem prostudovat charakteristiky a podmínky prostředí a seznámit se s testy předchozích studií, abychom zjistili vhodné metody optimalizace degradačního potenciálu domorodé mikroflóry. Aplikace *in situ* bioremediačních technologií (*PRB*, *bioaugmentation*, biostimulační procesy) při použití *in vitro* mikroflóry na kontaminované půdy vyžaduje navržení odpovídajících podmínek pro růst mikroorganismů, aby nedošlo k rozdílu mezi výsledky laboratorních a terénních studií. (Wolfgang a kol, 1995, Boopathy, 2004). Nadbytek vstupů do kontaminovaného prostředí může působit toxicky a negativně ovlivnit přírodní společenstva a tím i proces degradace (Kalin, 2004).

2.5 Podpovrchová mikroflóra

V mikrobiologických studiích je použití termínu "hluboce podpovrchové" (deep subsurface) poměrně nejasně definované. Ghiorse a Wobber definovali hluboké „aquifer systems“ jako "ty, které jsou stovky až tisíce metrů pod zemským povrchem." (Derek a kol, 1995)

Mnoho badatelů však používá tento termín pro sedimenty nacházejících se v hloubkách větších než 10 metrů. Použití libovolných hloubek pro oddělení "deep" od "shallow" sedimentů je pravděpodobně nevhodné, protože "hluboké" má různé významy v různých disciplínách. V pedologii může pojem "hluboký" odkazovat na vzdálenosti větší než 2 nebo 3 metry. V geologii ropy se pojem "hluboký" jen zřídka používá k popisu usazeniny, které jdou méně než 3000 m pod zemský povrch. (Derek a kol, 1995).

Základní mikrobiologické přísloví říká: "Všechno je všude, životní prostředí samo vybírá" ("Everything is everywhere, the environment selects"), což tedy potvrzuje všechny shromážděné znalosti o podpovrchových mikroorganismech. Vskutku, mikroorganismy a zejména bakterie, rychle osídlují všechny možné lokality na Zemi, včetně podzemních. (Bachofen a kol, 1998)

Mikroorganismy jsou jediné formy života, které mohou masově obývat hluboké podpovrchové prostředí, protože typické porézní prostředí je příliš úzké pro jiné typy života. (Derek a kol, 1995). Předpokladem znalosti mikrobiálních procesů, které lze očekávat v různých místech prostředí, jsou znalosti o rozmanitosti a rozdělení podzemních bakterií. Důležité skupiny pro podpovrchové prostředí jsou bakterie redukujících sírany, bakterie oxidujících síru, železo-oxidující bakterie, železo-

redukující bakterie, methanogenní bakterie a obecně heterotrofní bakterie. Studie za posledních 10 let ukázaly, že pod povrchem se nacházejí různé typy mikrobiálních ekosystémů, které jsou neočekávaně hustě obydlené. Jedním z příkladů budiž studie o heterotrofních bakteriích obývajících hluboké vrstvy paleosolu, včetně původně neznámého kmene *Crenarchaea*, blízkého příbuzného kmene z termálních Fe/S proudů v Yellowstoneském národním parku, USA (Lee a Krumholz, 2000). Z práce Bachofena a kol. (1998) vyplývá, že v půdních odběrech vzorků z hloubky 2 m, 6 m a 12 m, byla většina izolovaných mikroorganismů fakultativními anaeroby. Sírany redukující bakterie převažovaly v hloubce 12 m, ale na rozdíl od sírných bakterií byly obecně velmi málo početné. Hlavní heterotrofní bakterie, zjištěné v podzemních vodách vzorku z hloubky 259 až 281 metrů, byly kovové *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus* a *Clostridium*. To naznačuje, že nalezené mikroorganismy byly spíše nečistoty původem z vrtání (Bachofen a kol, 1998). V jiné práci Elhottova a kol. (2006) byly nalezeny životaschopné mikroorganismy v miocenních jílech jezerní formace Cypřiš vytěžených z hloubky 200 m pod povrchem během povrchové těžby hnědého uhlí (Sokolovská hnědouhelná pánev, Česká republika). Byly izolovány z intaktních sedimentů dvě saprotrófní houby rodu *Penicillium*, *Cladosporium*, *Verticillium*, a *Aspergillus*, jakož i heterotrofní zástupci bakterie rodů *Nocardiopsis*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Rothia*, *Kocuria*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Acinetobacter*, *Microbacterium* a *Pseudomonas*. (Elhottova a kol, 2006)

Mluvíme-li o podmínkách pro život mikroorganismů v hlubokém podpovrchovém prostředí, lze tvrdit, že pokud mají k dispozici vhodné zdroje energie, jsou hlavními faktory omezujícími distribuci mikrobiálního života v hluboké podpovrchové vrstvě pravděpodobně teplota a vodní aktivita. (Derek a kol, 1995). Biologické procesy v těchto hloubkách jsou poněkud pomalé, protože jsou často omezeny nedostatkem dostupných živin. (Bachofen a kol, 1998). Vědecky všeobecně uznávaná mezní teplota pro mikrobiální život v hlubokém podpovrchovém prostředí je přibližně 110°C, ale někteří mikrobiologové považují za skutečnou horní hranici hodnoty blíží se 150°C. (Derek a kol, 1995)

Některé mikroorganismy mají schopnost přežít nepříznivé podmínky mnoho stovek let. Mohou být zde přítomny jako spory, čekající na dobu kdy nastanou příhodné podmínky pro růst. Například termofilní sulfát-redukující bakterie byly popsány jako velmi oportunní bakterie, které rychle reagují na změny. (Bachofen a kol, 1998)

Mikrobiální procesy, které probíhají v hlubokém podpovrchovém prostředí se neomezují jen na získávání zdrojů pro život, ale také mohou přispět k tvorbě nebo změně fosilních paliv v prostředí. Ačkoliv někteří badatelé se domnívají, že ropa může být tvořena čistě mikrobiálními procesy. Obecně je však přijímáno, že mikrobiální příspěvek k tvorbě ložisek ropy a uhlí je selektivní, mikroorganismy musí selektivně odstranit labilní organické sloučeniny z organické hmoty, která je následně pomocí abiotických procesů transformována do fosilních paliv. Tedy počátkem tvorby ropných a uhelných ložisek jsou ve skutečnosti produkty, vzniklé při nedostatku mikrobiální degradace velkého množství organické hmoty. Kromě příspěvku k tvorbě fosilních paliv mohou mikrobiální procesy v hluboké podpovrchové prostředí přímo generovat metan (Derek a kol, 1995). Vědci postulovali, že původní mikroorganismy žijící v blízkosti ropných zásob mohou zřejmě růst za pomoci katabolických komponentů podzemní ropy. V nedávné studii bylo zjištěno, že mikroorganismy vyskytující se v ropných vrtech využívají jako zdroj energie ropná ložiska. V zásobnících ropy a v jiných podpovrchových místech omezují růst mikroorganismů různé faktory. Těmito faktory mohou být jak přítomnost anorganických živin, terminálových elektronových donorů, vody, a pórovitost. (Lee a Krumholz., 2000)

Typy mikrobiálního metabolismu, které se nacházejí podzemním prostředím, jsou pravděpodobně podobné procesům v povrchových sedimentárních prostředích. Studie o mikrobiologii vodních sedimentů a půd nám poskytují srovnávací modely pro druhy mikroorganismů a jejich aktivit, které by mohly být očekávány v hlubokých podpovrchových prostředích. V posledním desetiletí se ukázalo, že většina, ne-li všechny fyziologické typy mikroorganismů, které jsou považovány za důležité v sedimentárních prostředích, lze taky získat z hlubokých podpovrchových prostředí. (Derek a kol, 1995). Pomocí laboratorních kultur je však velmi těžké získat reprezentativní sadu skutečných bakteriálních populací přítomných v přírodní prostředí, neboť jen malá část celkové mikroflóry je schopná růst v laboratorních podmínkách. Diverzitu bakteriálních kolonií, které rostou na kultivačním médiu, proto nelze považovat za reprezentativní výčet přírodních populací. (Boivin-jahns a kol, 1996)

Tedy v dnešní době už většina studií prokázala širokou rozmanitost mikroorganismů, které lze získat z hlubokého podpovrchového podloží, a že jejich činnost může významně ovlivnit geochemii hlubokých podpovrchových prostředí. (Derek a kol, 1995)

V současné době jsou metody pro měření podpovrchových mikrobiálních procesů přímo *in-situ* bohužel velmi omezené, pro lepší pochopení problému je nutné je zkoumat v optimálním prostředí. Řešením by bylo "vzít laboratoř za mikroby a nikoliv mikroorganismy do laboratorního prostoru". Obvykle je to technicky docela komplikované, zejména v podloží, ale široké spektrum technických problémů již bylo v posledních letech zvládnuto. (Bachofen a kol, 1998)

Spolu se všemi těmito poznatky můžeme tvrdit, že rozmanitost mikroorganismů na povrchu a pod povrchem dovoluje provádět téměř jakékoli termodynamicky příznivé reakce. Ve skutečnosti je však diverzita vždy omezována abiotickými faktory, jinak by problémy kontaminace neexistovaly. Plány do budoucna zahrnují experimenty vedoucí k prohloubení znalostí o vztazích mezi podpovrchovými organismy a jejich přírodními energetickými zdroji, navíc ještě vztahy k antropogenním kontaminantům. Výsledky těchto studií nám neposlouží jen při předpovídání osudu kontaminujících látek v různých podpovrchových systémech, ale mohou také pomoci při vývoji postupů, které jsou navrženy tak, aby pomáhaly stimulovat aktivitu endogenní mikroflóry pro bioremediační účely. (Lee a Krumholz., 2000)

KAPITOLA 3

Cíle práce

- 1) otestovat získané kmeny hlubinné mikroflóry na jejich schopnost růst na naftě jako příkladu alifatických ropných látek a na toluenu jako příkladu aromatických ropných látek.
- 2) pokusit optimalizovat kultivaci testovaného kmene, vymezit optimální růstové podmínky
- 3) otestovat rychlost růstu a mikrobiální aktivitu vybraných kmenů v podmínkách simulujících půdní poměry.
- 4) posoudit využitelnost těchto kmenů v praktických remediacích.

Kapitola 4

Metodika

4.1 Použité chemikálie, biologický materiál, testované vzorky

4.1.1 Používané látky

Všechny látky, které použity v této studii byly sterilní. V experimentu byly jako modelová směs organických uhlovodíků použity nafta a k tomu ještě toluen. Před použitím v experimentu byla nafta sterilizována klavováním, a toluen filtrací přes filtr s PTFE membránou LPT 2522-100 firmy Cabicon.

4.1.2 Příprava media

Bylo použito minerální růstový médium (GM) (Petsch a kol, 2001), obsahující 7,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 5,9 mM KH_2PO_4 , 0,8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH = 7,2). GM medium jsme autoklávovali při teplotě 121°C do 1,5 hodin. Přidávali jsme do lahví se vzorkem 3 ml GM medium.

Bakterie a streptomycety z těchto vzorků byly pěstovány na agaru R2A a agaru se sójovým extraktem (TSB) při pH 7,2 při 20°C ve tmě (Elhottova a kol, 2006). Medium R2A bylo připraveno podle návodu výrobce o složení: R2A Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), (g/l): kvasničný extrakt 0,5; proteosa pepton 0,5; hydrolizovaný kasein; glukóza 0,5; rozpustný škrob 0,5; pyruvát sodíku ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$) 0,3; hydrogen fosforečnan draselný (K_2HPO_4) 0,3; síran hořečnatý (MgSO_4) 0,05; agar-agar 12, pH 7,2.

BBL medium bylo připraveno podle návodu výrobce: TSB (30 g) rozpuštěno v 1 l destilované vody a sterilizováno při teplotě 121°C do 15 minut. Zklávováno v

erlenových baňkách. Nakonec jsme optimalizovali růstové médium pro buňky M9-2006, rostlé na sójovém agaru.

Pro přípravu sójového agaru jsme použili níže uvedené chemikálie: sójová mouka 1,5%, natrium chlorid 0,3% (NaCl), agar 2,5%, uhličitan vápenatý 0,3% (CaCO₃), glukóza 1%, při pH 6,1-6,2.

4.1.3 Biologický materiál

Bakteriální kmeny, (kultivovatelné heterotrofní bakterie a streptomycety) byly pro účely studie izolovány z hloubek 30 - 150 m z jílových miocenních vrstev tvořících nadloží uhelných slojí v okolí Sokolova. Lamelové sedimenty z 30 m hloubky uhelného dolu Družba u Sokolova (Česká republika) jsou detailně charakterizovány v práci Frouz a kol., (2011), které jsou použity pro tuto studii jako biologický materiál. V předchozích studiích (Elhottová a kol, 2006, Frouz a kol, 2011) bylo celkem izolováno a vyselektováno 25 kmenů ze sedimentu uhelného dolu Družba. Z těchto 25 kmenů, jsme vybrali pro naše studie 7 kmenů, které byly testovány na schopnost degradovat naftu a toluen. Tyto kmeny zahrnují 4 bakteriální kmeny (M3B5-2009, M3B6-09, M1A8-09, M19-2010) a 3 kmeny streptomycet (M9-2006, M1B1-2009, M3A-2009). Tyto kmeny jsou podrobně popsány v Tab. 1.

4.1.4 Charakteristika testovaných vzorků

Byl proveden screening heterotrofních kultivovatelných bakterií, izolovaných z hlubokého podloží jílových miocenních vrstev v okolí Sokolova, na schopnost rozkládat organické látky; a použít jako jediný zdroj energie naftu a toluen.

Kmen streptomycét (Tab.1) (*Streptomyces spp.* MIO9) použitý v této studii byl již dříve studován (*Streptomyces spp.* MIO9, viz Chroňáková a kol, 2010). Zbytek izolovaných kmenů byl identifikován pomocí *EzTaxon-e serveru* na základě údajů 16S rRNA sekvence. (EzTaxon-e server, Kim a kol, 2012). Testované kmeny byly vybrány z knihovny databáze *GenBank*, izolovaných z jílu miocénu, aby mohly reprezentovat co nejširší taxonomické spektrum bakterií. Sekvence kmenů jsou uloženy v databázi *GenBank* pod přístupovým č. KC469951-KC469969 (Tab.1).

Název kmene	inventární číslo (Accession No.)
<i>Streptomycetaceae</i>	
<i>Streptomyces clavifer</i> M3A-2009	KC469956

<i>Streptomyces</i> sp. MIO9-2006 (<i>S. platensis</i> group)	EU098012
<i>Streptomyces</i> sp. M1B1-2009 (<i>S. somaliensis</i> group)	KC469955
<i>Micrococcaceae</i>	
<i>Arthrobacter halodurans</i> M3B6-2009	KC469961
<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> M19-2010	KC469964
<i>Arthrobacter defulvii</i> M1A8-2009	KC469959
<i>Arthrobacter</i> sp. M3B5-2009 (<i>A. oxydans</i> group)	KC469960

Tabulka 1. Seznam použitých kmenů izolovaných z hlubokých podpovrchových vrstev (30-150 m) miocenních sedimentů (vzorky v otevřené jámě "Držba" u Sokolova, Česká republika) Podle Chroňákové (nepublikováno).

4.1.5 Příprava inokula

Bakteriální kultury použité pro následující experimenty, založené na pěstování v submerzní kultuře a respiračních měřeních, byly získány z glycerinových kryokonzerv. Streptomycety byly předpěstovány na R2A agaru, bakterie v tekuté kultuře bujonu (BBL medium). Každý kmen byl naočkován na několik misek – u streptomycet každý kmen na 3 misky, u bakterií každý kmen na 4 misky. Poté jsme nechali vše kultivovat v kultivačním boxu: bakterie na 3–4 dny, streptomycety na 1 týden. Normalizované množství bakteriálního inokula jsme připravili pomocí pracovní suspenze buněk bakterií. Testované bakteriální kmeny byly pěstovány aerobně v tekutém médiu GM (při 28°C, ve tmě, za míchání 180 rpm). Kmeny streptomycet byly pěstovány na R2A agaru. Kvantitativní odhad bakteriální biomasy byl proveden ze spektroskopických měření, kde byla optická densita při 600 nm odhadnuta za použití přístroje Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Hustota buněk byla vypočtena podle vzorce $OD_{600} 1,0 = 8 \times 10^8$ buněk / ml.

V každém pokusu s vybranými kmeny jsme měli série se suspenzí testovaného kmene a k tomu ještě kontrolní sérii. Kontrolní lahve, bez vzorku kmene, byly použity k posouzení CO₂ zachycením při manipulaci. Všechny nástroje, nádoby a chemikálie byly sterilizovány.

Pro přípravu suspenze spor na misce se sójovým médiem byl masivně očkovat testovaným kmenem. Přibližně po třech týdnech došlo ke sporulaci. Na misku bylo pipetou nanášeno 5 ml GM média a pomocí jednorázové sterilní kličky byly do média uvolněny spory. Vzniklá suspenze byla odsáta a přenesena do sterilních zkumavek s 1 cm vatovým filtrem. Po filtraci bylo získána počet buněk 1⁹ na 1 ml suspenze. Tento

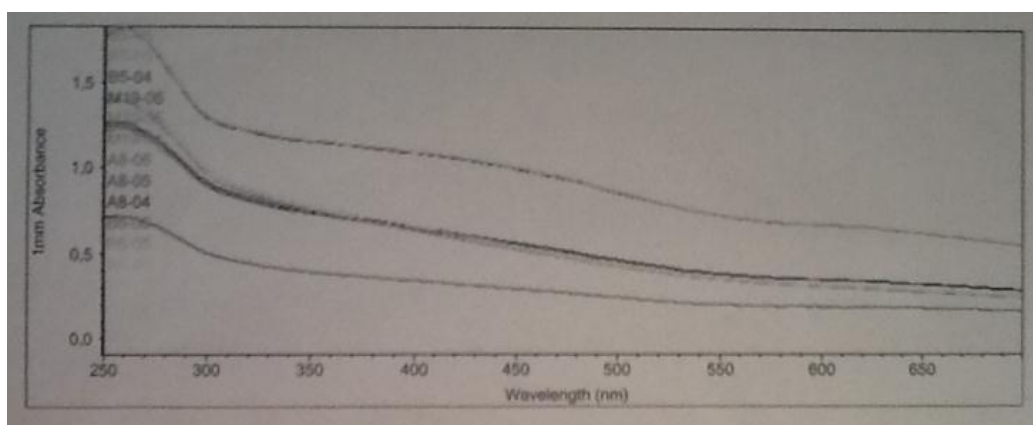
objem byl přenesen do 15 ml flakonku. Následovala centrifugace po dobu 10 min, při síle 2000 g; supernatant byl odsát. Poté si vytvoříme ředící řadu. Následně byla od 1 ml odečtena koncentrace spor/ml – barvením DAPI.

Absorbance byla proměřována třikrát při vlnové délce 600 nm. Výsledky proměřených hodnot uvedeny v Tab.2. Z těchto hodnot pak byla jako aritmetický průměr vypočtena hodnota optické denzity, díky které jsme mohli vypočítat koncentraci kmenu, kterou musíme přidat do láhve.

<i>Sample ID</i>	<i>A600</i>	<i>Cursor nm</i>	<i>Cursor Abs</i>
B6-04	0,301	280	1,237
B6-05	0,289	280	1,207
B6-06	0,285	280	1,203
A8-04	0,331	280	1,112
A8-05	0,324	280	1,094
A8-06	0,326	280	1,074
M19-04	0,651	280	1,564
M19-05	0,642	280	1,584
M19-06	0,646	280	1,567
B5-04	0,165	280	0,616
B5-05	0,168	280	0,618
B5-06	0,167	280	0,601

Tabulka 2. Výsledky naměřených hodnot optické denzity suspenzí testovaných kmenů pomocí provedení kalibrace přístrojem Thermo Scientific.

K tomu ještě bylo uděláno kalibrace optických denzit suspenze. Změřená kalibrace zobrazeno v Obr. 1



Obrázek 1. Kalibrace naměřených hodnot optické density suspenze testovaných kmenů při vlnové délce A 600.

Dále jsme spočítali, kolik musíme přidat suspenze bakteriálního kmenu (ml) do laboratorní láhve. Toho jsme dosáhli pomocí spočítání optické density bakteriálního kmenu.

<i>Vzorek</i>	<i>A600</i>	<i>Mean</i>	<i>počet bunek v ml (10^8)</i>	<i>Ředění na $1 \cdot 10^8$ (ml GM)</i>	<i>ml kultury</i>	<i>Celkový objem (ml)</i>
M3B6		0,292	2,336	20,04	3	23,04
M3B6-04	0,301					
M3B6-05	0,289					
M3B6-06	0,285					
M1A8		0,327	2,616	24,24	3	27,24
M1A8-04	0,331					
M1A8-05	0,324					
M1A8-06	0,326					
M19		0,646	5,168	20,84	1	21,84
M19-04	0,651					
M19-05	0,642					
M19-06	0,646					
M3B5		0,167	1,336	16,8	10	26,8
M3B5-04	0,165					
M3B5-05	0,168					
M3B5-06	0,167					

Tabulka 3. Výsledky naměřených hodnot spotřeby suspenze testovaných kmenů pro potřebu na experiment jako přídatku do laboratorní lahvi.

Pro inokulace byla zvolena koncentrace $1 \cdot 10^8$ počet buněk / ml. 9 ml této suspenze s ředěním 10^1 bylo naředěno na 31,5 ml GM média, pro kontrolu byl proveden odečet DAPI (Elhottova a kol, 2006). Výsledná koncentrace byla $1,53 \cdot 10^8$ počet buněk/ml.

Stejně množství bakteriální biomasy každého kmene bylo inokulováno s GM medium a s GM medium doplněným různými koncentracemi nafty a toluenu. Inkubace byly provedeny ve tmě při teplotě 28°C ve dvou sériích, se vzorkem suspenze a kontrolní výsev. Do 100 ml sterilní skleněné láhve bylo přidáno 3 ml kapaliny GM a 1

ml buněčné suspenze. Do vnitřku této láhve jsme umístili skleněnou baňku s 6 ml 0.25N NaOH a systém byl vzduchotěsně uzavřen. CO₂, který se uvolnil ze sedimentu byl zachycen v NaOH a poté kvantifikován titrací s 25 mM HCl s přidavkem BaCl₂, po dobu dvou termínů kultivace. Po prvním a druhém týdnu kultivace bylo v láhvi se vzorkem provedeno stanovení bazální respirace.

4.2 Růst a respirace bakteriálních kultur na naftě a toluenu

Sledování růstu a respirace jednotlivých bakteriálních kmenů na naftě a toluenu probíhalo jednak na tekutém médiu, jedna na písku obohaceného živým roztokem a naftou nebo toluenem.

Pro sledování v kapalném médiu jsme pro každou kulturu připravili řadu 12 lahví představujících jednotlivé varianty (vždy po 5 opakováních), do každé laboratorní láhve jsme antisepticky napipetovali 3 ml sterilního, dobře promíchaného minerálního média GM. Poté jsme přidali 1 ml suspenze zkoumané kultury a nakonec různé objemy toluenu a nafty (2, 4, 80, 200 µl); Po přidavku toluenu a nafty jsme laboratorní lahev uzavřeli.

Naočkované kultury na živné půdě byly inkubovány 7-14 dní při teplotě 28°C. Růst bakterií jsme hodnotili vizuálně po 2 – 3 dnech (zákal média v porovnání s jinými sadami) a po skončení kultivace byl zjištěn úbytek organických uhlovodíků pomocí měření respirace.

Pro pěstování na písku jsme do laboratorní láhve přidávali 5g sterilního písku, GM medium a různé koncentrace nafty nebo toluenu. Dále jsme měli jednu sadu s glukózou. Celkový přehled experimentálního návrhu je podrobně popsán v Tab.4. Následně proběhlo měření respirace, stanovení počtu buněk pomocí barvení DAPI, měření délky mycelií a vyčíslení CFU.

Princip práce v prvním kole: každý kmen jsme kultivovali při teplotě 28°C v písku a s přidavkem nafty nebo toluenu. Do láhve jsme dali 5 g písku, 3 ml GM media a 30 µl nafty a následně sterilizovali v autoklávu. Tento postup nám zajistí, že získáme pouze typy kmenů, které dokáží růst v přítomnosti nafty.

Ve druhém kole experimentu jsme vyextrahovali 4 kmeny s nejlepší schopností růstu na naftě: *M9-2006*, *M1B1-2009* (streptomycety) a *M1A8-09*, *M19-2010* (bakterie). Tyto kmeny bakterií byly pěstovány v submersní kultuře při teplotě stejné jako v prvním kole experimentu. Streptomycety byly pěstovány, podobně jako v prvním

kroku práce, na R2A agaru. Rozdíl byl pouze v obsahu láhve. Bylo použito 5 g písku a 3 ml GM a s přidavkem 1 %, 5 %, 10 % nafty a toluenu. Na konci tohoto experimentu bylo zjištěno, že nejlepší výsledky vzkazoval kmen M9-2006. Ve třetím kole experimentu jsme pracovali pouze s výsledným kmenem **M9-2006**. Byly vytvořeny různé růstové agary (R2A, sojový) a testovali jsme růst tohoto kmene při rozdílných koncentracích nafty a toluenu.

4.2.1 Stanovení bazální respirace půdy titrační metodou

Princip tyto metody je takový, že oxid uhličitý (CO₂) produkovaný půdními organismy se absorbuje v roztoku hydroxidu sodného. Množství nezreagovaného hydroxidu se stanoví titračně kyselinou chlorovodíkovou.

Do každé inkubační lahve byl vložen kalíšek s NaOH, po vložení kalíšku s hydroxidem byla láhev ihned uzavřena a byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 7 dnů. Pro stanovení druhé bazální respirace jsme inkubovali dalších 7 dnů. Zaznamenávali jsme čas začátku inkubace a čas titrace vzorku.

Stanovení bazální respirace: po ukončení inkubace jsme obsah kalíšku vylili do kádinky, kalíšek dvakrát vypláchli destilovanou vodou. Do kádinky jsme přidali 3,5 ml BaCl₂ a několik kapek fenolftaleinu. Titrovali jsme HCl až do odbarvení vzorku (bod ekvivalence) a zaznamenávali spotřebu HCl.

Pro výpočet bazální respirace byla použita rovnice:

$$R = (A - B) \cdot c_{\text{HCl}} \cdot 6005 / (\text{navážka} \cdot \text{sušina} \cdot \text{doba inkubace})$$

[μg C-CO₂ / g půdy * hod]

kde,

A – spotřeba HCl na titraci blanku v ml

B – spotřeba HCl na titrace vzorku v ml

c_{HCl} – přesná koncentrace roztoku HCl v mol·l⁻¹ = 10,489/faktor HCl * 0,1

6005 – přepočtový koeficient

Byly zaznamenány tyto naměřené faktory HCl: 12,45, 12,42, 12,54 ml. Po ztitrování všech vzorků jsme do každé láhve přidali nový kalíšek s 6 ml 0,25 molárním NaOH. Po 7 dnech kultivace byly láhve se vzorky otevřeny ve sterilním boxu, pomocí pinzety byly kalíšky s NaOH vyjmuty a ihned ztitrovány.

Sediment s GM médium byly pomocí sterilní špičky promíchány a následně jsme odebrali do sterilní ependorfky 100 μl suspenze. Poté bylo 100 μl suspenze

naředěno na: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 . Takto naředěnou suspenzi jsme použili pro stanovení růstu kmenu, pomocí barvení DAPI a poté pro orientační výsev na miskách. Po týdnu kultivace byly odečteny CFU.

Tato experimentální práce, jako bazální respirace, ukazuje na respirační aktivitu mikroorganismů, která posuzuje respirační aktivitu z aktuálního stavu v půdě a zejména závisí na množství dostupného substrátu pro respirace mikroorganismů.

4.2.2 Epifluorescenční mikroskopie – DAPI

Pro sledování celkových počtů bakterií epifluorescenční mikroskopií bylo použito barvivo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). (Elhottová a kol, 2006)

Epifluorescenční mikroskopie uvádí údaje o celkových počtech, zejména poskytuje lepší odhad skutečného počtu přítomných bakterií, naopak nepodává informace o jejich životaschopnosti a rozmanitosti. (Bachofen a kol, 1998)

DAPI je specifické barvivo a poutá se k dvoušroubovici DNA, obzvláště k částem bohatým na adenin a thymin. Proto vytváří na pozadí lépe identifikovatelné skvrny než jiná barviva (např. *acridine orange* – $C_{17}H_{20}ClN_3 \cdot 1/2 ZnCl_2$). DAPI patrně zabarvuje vnitřní části buněk. (Bloem, 1995). Pro zjištění počtů spor a buněk pomocí epifluorescenční mikroskopie jsme použili 1 ml suspenze na 10^3 ředění. Na dvaceti polích jsme zjišťovali, kolik budeme mít buněk v různých sadách.

1 ml vzorku byl obarven 0,05 ml pracovního roztoku DAPI. Vzorek byl přefiltrován přes 0,2 μm pórovitý polykarbonátový filtr (GE Polycarbonate, Black, 0,22 Micron, 25 mm, GE Water & Process Technologies, USA). Poté byl filtr umístěn na podložní sklo a k tomu přidána kapka nefluorescenčního imerzního oleje (Olympus, Immersion oil, Japan), překryli jsme krycím sklíčkem a opět nanесли jednu kapku imerzního oleje.

Bakterie jsme počítali s použitím epifluorescenčního mikroskopu BX 60 (firma Olympus, Japonsko) při zvětšení 1000 x. Počty bakterií na ml suspenze vzorku jsou kalkulovány podle následujícího vzorce:

$$\text{počet buněk/ml} = N * z * r$$

kde,

N = počet buněk/ na jednom pole

z = přepočtový factor, 103628,72

r = použité ředění

4.2.3 Délka mycelia

Délka mycelia odpovídá množství narostlé biomasy těchto buněk. Při pohledu do mikroskopu byly zaznamenány někde jenom spory, někde se vyskytovala pouze mycelia. Když máme mycelium, znamená to, že spora tam vyklíčila a vyrostla. Proto jsme rozhodli změřit délku mycelia, pro zjištění informací o aktivitě buněk.

Délky mycelia na ml suspenze vzorku jsou kalkulovány podle následujícího vzorce:

$$\text{Délka mycelia/ml} = Z * 103628,72 * r$$

kde,

Z = průměrná délka mycelia na jednom poli

103628,72 = přepočtový faktor

r = použité ředění

Mycelia jsme počítali s použitím epifluorescenčního mikroskopu BX 60 (firma Olympus, Japan) při zvětšení 1000 x, a dále jsme třikrát po sobě měřili délku mycelia na poli pomocí programu Quick Photo.

4.2.4 Vypočet jednotek tvořících kolonie (CFU)

Colony forming units (CFU nebo kolonie tvořící jednotky) poukazuje na počet životaschopných bakteriálních kmenů. Na rozdíl od přímého mikroskopického počítání, kde jsou všechny buňky buď mrtvé nebo živé, CFU ukazuje jen životaschopné buňky. Výsledky jsou uvedeny jako CFU / ml (kolonie tvořících jednotek na ml)

Vypočet CFU složený na 1 ml suspenze kalkulovány podle vzorce:

$$\text{CFU/ ml} = w + 5 + 10\,000$$

kde,

w= počet kolonie na misce

5= je to násobení 5x, inokulováno bylo 0,2 ml vzorku, proto děláme přepočet na 1 ml.

10 000 = přepočet na základní ředění

4.3 Výběr kmene s nejlepšími schopnostmi růst na organických uhlovodících

Ze sedmi testovaných kmenů, které byly vybrány pro studie, v průběhu výzkumu byl vybrán jeden kmen s nejlepšími růstovými schopnostmi z hlediska jeho růstu na media s

přídavkem nafty nebo toluen a stupni mineralizace. Proveden byl celý výběr za předpokladu, že kmen projevující významnější růstové schopnosti s naftou a toluenem jako jediným zdrojem uhlíku a energie, bude nejefektivnější při rozkladu nafty a toluenu a nejvhodnější pro další pokusy a taky možná využití v praxi. Mukherji a kol. (2004) ve své práci tvrdí, že míra utilizace ropných látek mikroorganismy je závislý na intenzitě růstů bakteriálního kmene a případně jejich biomase. Výběr kmene, který vykazuje lepší schopnosti růst na ropných uhlovodících byl uskutečněn podle několikanásobného výběrového testu.

4.3.1 Optimalizace kultivace

Za účelem optimalizace kultivace testované kmene byla provedena série pokusů. Tyto experimenty zahrnuje: i) provedení optimalizaci složení růstového media, ii) zhodnocení dopadu koncentrace nafty, toluenu v mediu na průdkost růstů testovaných kmene a mineralizace.

Pro optimalizaci pokusů byl při práci s streptomycetou M9-2006 použit místo R2A agaru sojový agar. Druhý faktor při optimalizaci pokusů bylo použití různých koncentrací nafty a toluenu v růstovém mediu. Při pokusu byl hodnocen růst inokula při různých koncentrací nafty a toluenu, respektive, 0,05%, 0,1%, 1%, 2%, 5% v GM mediu.

Případný vliv použití odlišných koncentrací zdrojů uhlíku - nafty, toluenu - a v jednom případě glukózy, Růst kultury v pokusných kultivace byl hodnocen podle serii pokusů, jehož návrh je pro přehlednost uveden v Tab. 4.

SADA 1 (A)	SADA 2 (B)	SADA 3 (C)	SADA 4 (D)	SADA 5 (E)	SADA 6 (F)	SADA 7 (G)	SADA 8 (H)	SADA 9 (I)	SADA 10 (J)	SADA 11 (K)	SADA 12 (L)
5g písek 3ml GM	5g písek 2,92mlG M 80μl gluk.	5g písek 3ml GM 2 μl oil	5g písek 3 ml GM 4 μl oil	5g písek 2,96ml GM 40 μl oil	5g písek 2,92ml GM 80 μl oil	5g písek 2,80ml GM 200 μl oil	5g písek 3 ml GM 2μl toluen	5g písek 3ml GM 4μl toluen	5g písek 2,96ml GM 40μl toluen	5g písek 2,92ml GM 80μl toluen	5g písek 2,80ml GM 200μl toluen

GM + sand (5 g)	GM + sand 1% GLUK	GM + sand 0,05% OIL	GM + sand 0,1% OIL	GM + sand 1% OIL	GM + sand 2% OIL	GM + sand 5% OIL	GM + sand 0,05% toluen	GM + sand 0,1% toluen	GM + sand 1% toluen	GM + sand 2% toluen	GM + sand 5% toluen
-----------------	-------------------	---------------------	--------------------	------------------	------------------	------------------	------------------------	-----------------------	---------------------	---------------------	---------------------

Tabulka 4. Experimentální návrh práce, při kterém byl pozorován vliv zdroje uhlíku a jeho koncentrace na kultivaci inokula různých testovaných kmenů a jeho růst během pokusu.

4.4 Statistické hodnocení výsledků

Ke statistickému zhodnocení získaných dat byl použit program InStat společnosti GraphPad. Posuzování rozdílnosti růstu kmene M9-2006 v různých substrátech bylo prováděno pomocí metody „One – way ANOVA“ následovanou multiple comparison post test – Tukey test. Výsledky těchto analýz jsou v textu uváděny jako signifikantní rozdíly významné na hladině významnosti $p=0,05$ a nižší.

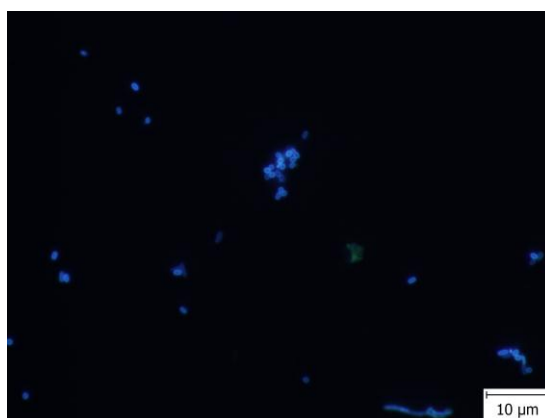
Kapitola 5

Výsledky

5.1 Výběr kmene s nejlepšími růstovými schopnostmi

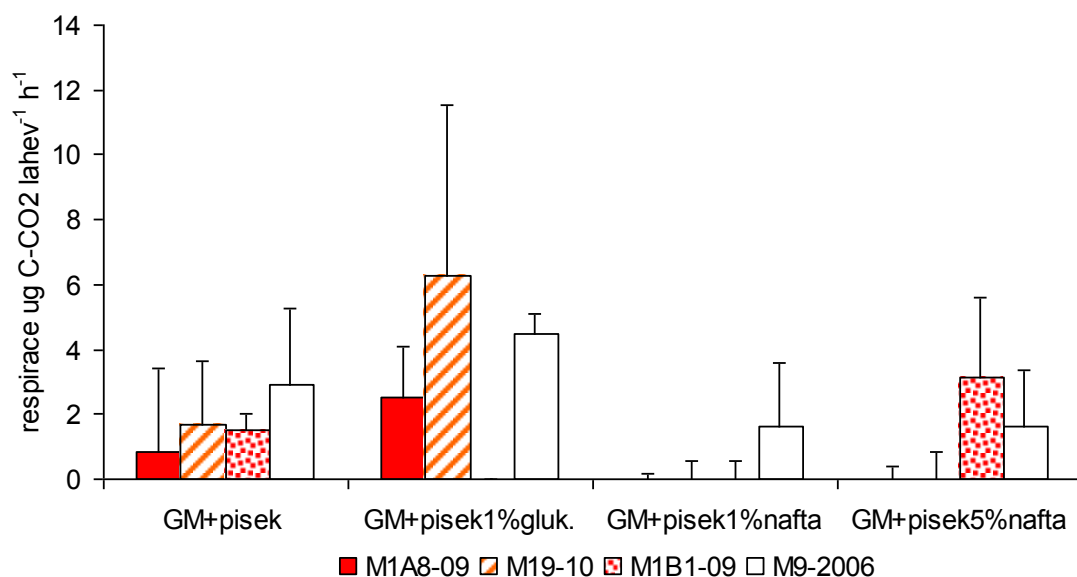
Ze sedmi testovaných kmenů byly čtyři schopné dobře růst na substrátu nabízeného minerálního média s naftou a toluenem.

Naše čtyři kmeny rostly dobře na agaru s minerálním médiem s přídavkem naftou a toluenu, ale pouze dva kmeny *Streptomyces* sp. MIO9 (M9-2006) a *MIB1-09* rostly lépe na substrátu s 5% naftou. Kmen *M9-2006* ukázal v předchozích zkouškách efektivnější růst na substrátech, proto jsme jej nakonec vybrali a použili k dalšímu testování schopnosti využít komplexní media jako benzen a toluen v různých koncentracích. Pro srovnání, kmen *M19-2010* vzkazoval slabý růst na všech testovaných substrátech. Podle srovnání stupně degradace nafty různými mikroorganismy se ukázalo, že kmen *M9-2006* efektivněji využívá ropné uhlovodíky a toluen. (Obr. 2)



Obrázek 2. Kmen *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group), který ukázal největší životaschopnost při růstu na substrátech s přídavkem organických uhlovodíků, nafty a toluen.

Podle výsledků provedeného testu stanovení bazální respirace vykazují všechny testované kmeny nejvyšší dychání (respirace) v substratu s obsahem glukózy výrazně vyšším než v jiných médiích. Kmen **M1B1-09** má přibližně stejnou hodnotu respirace jako kmen **M9-2006** rostlý v minerálním médiu s naftou (Obr 3). Kmen **M9-2006** vykazoval na naftě nejkozistnější výsledky (rostl a respiroval na obou koncentracích) a proto byl použit v dalších testech.



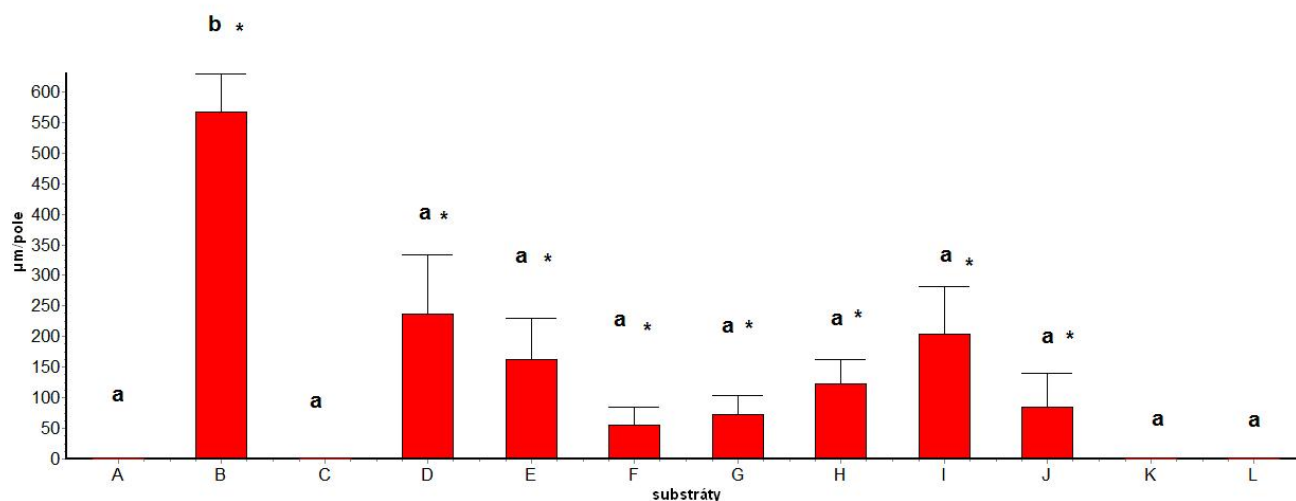
Obrázek 3. Respirace různých kmenů na písku s minerálním médiem, bez zdrojů uhlíku nebo s glukózou či naftou jako jediným zdrojem uhlíku.

5.2 Hodnocení růstu kmene M9-2006 a mineralizace různých substrátů

Pro hodnocení růstu kmene **M9-2006** a jeho mineralizace různých substrátů bylo posuzováno podle výsledků delek mycelia, počty buněk s použitím DAPI, počty jednotek tvořících kolonie.

5.2.1 Délka mycelia

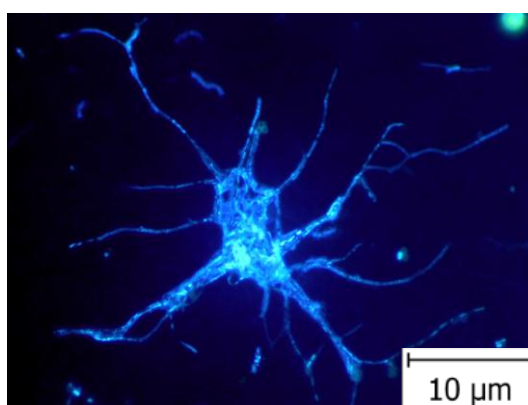
Obr. 4 znázorňuje rozdělení délek mycelia dle substrátu. Je zřejmé, že substrát B (s přidavkem glukóza) se výrazně podporuje statisticky významně větší délkou mycelia, než ostatní substráty mezi kterými není statisticky významný rozdíl. Nicméně na všech přidavek nafty a toluenu s výjimkou nízkých koncentrací nafty 0,05% a vysokých koncentrací toluenu (nad 2%) byl růst mycelia statisticky významně větší než na písku (t-test $p < 0.05$, data transformována, $\log n+1$)



Obrázek 4. Sloupkový graf průměrných hodnot a SEM (standard errors of mean) délek mycelia kmenu *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s různými přísadami.

A = písek + GM, B= písek + GM + glukóza, C= písek + GM + 0,05% nafta, D= písek + GM + 0,1% nafta, E= písek + GM + 1% nafta, F= písek + GM + 2% nafta, G= písek + GM + 5% nafta, H= písek + GM + 0,05% toluen, I= písek + GM + 0,1% toluen, J= písek + GM + 1% toluen, K= písek + GM + 2% toluen, L= písek + GM + 5% toluen. Statisticky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny (One way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$), sloupce označené * se statisticky významně liší od písku (t test, $p < 0.05$, data transformována, $\log n+1$)

V zájmu přehlednosti uvádím příklad maximálního růstu mycelia – substrát B s glukózou. (Obr. 5)



Obrázek 5. Fotografie mycelia kmenu *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s přísadkou glukózy. (10 μm)

Jak vyplývá z výsledků statické analýzy, ve srovnání s ostatními substráty je délka mycelia ze substrátu B (glukóza) signifikantně odlišná od ostatních ($P < 0,001$). To jen dokazuje, že ve variantu B je vysoká aktivita spor, tudíž jsme očekávali nejvyšší

hodnotu respirace. Ve variantů A, C, K, L se nevyskytovala žádná mycelia, byly pouze pozorovány jednotlivé spory. Ve variantu A nebyly spory aktivní, protože neměly přidáný zdroj organického uhlíku.

Výjimkou byly směsi D a I, od kterých se variant B v délkách mycelia příliš neliší, ale tento rozdíl může souviset s činností a aktivitou spor ($P < 0,01$). Jak vyplývá z experimentálních dat měření délek mycelia, ve variantu K se nevyskytovalo žádné mycélium, což odpovídá našim výsledkům s DAPI a statistickým výsledkům.

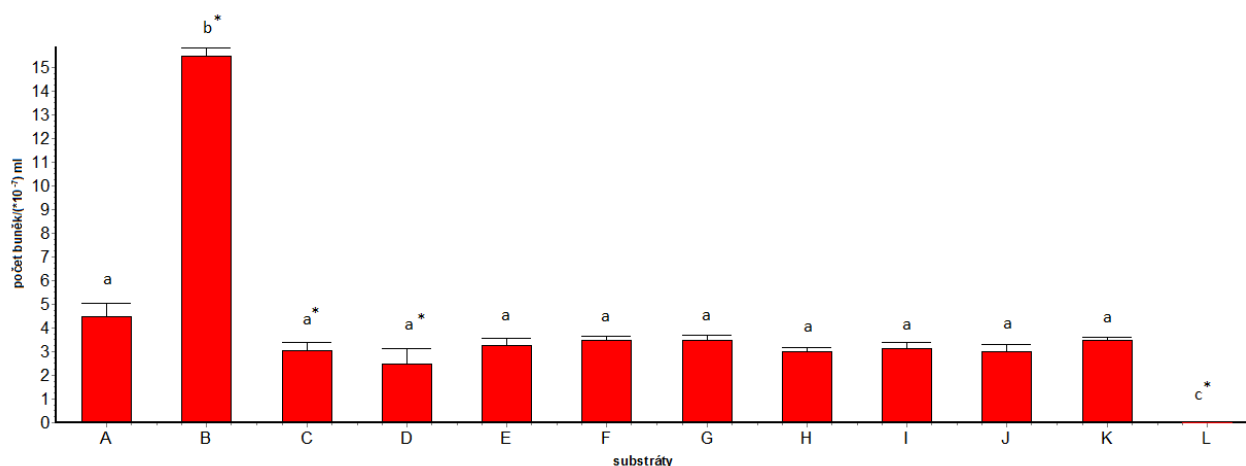
5.2.2 Stanovení počtu buněk pomocí epifluorescenčního mikroskopu barvením DAPI

Údaje získané z počítání mikrobiálních buněk barvením DAPI ukazují, že jsme dosáhli nárůstu bakterií, což také znamená, že buňky kmene streptomycet mohou růst s použitím energie organických uhlovodíků, v našem případě ropy a toluenu. Tyto údaje je podrobně zobrazují Obr. 5. Variant B s glukózou vzkazoval statisticky významně vyšší počet buněk než kultury narostlé na ostatních substrátech s výjimkou 5% toluenu, na kterém nebyly zaznamenány žádné buňky a jejich počet byl také statisticky významně nižší než na všech ostatních substrátech (One-way ANOVA test, Tukey test $p < 0,05$)

Z výsledků našich dat o celkové mikrobiální aktivitě anaerobních mikroorganismů *kmene M9-2006* vyplývá, že zvolené koncentrace nafty a toluenu byly odpovídající experimentálnímu designu a rozsahu spotřeby a inhibice zvolených bakteriálních kmenů.

Výsledky ukazují, že anaerobní mikroorganismy kmene streptomycet byly aktivní ve všech směsích s naftou a toluenem, kromě variantu s přídavkem 5 % toluenu, kde nebyly pozorovány živé buňky kmene *M9-2006*. (Obr. 6).

Vizuální vyhodnocení vykazovalo u všech substrátů vysoké množství narostlé biomasy, výsledky DAPI však ukazují, že všechny typy inkubací rostly různě.



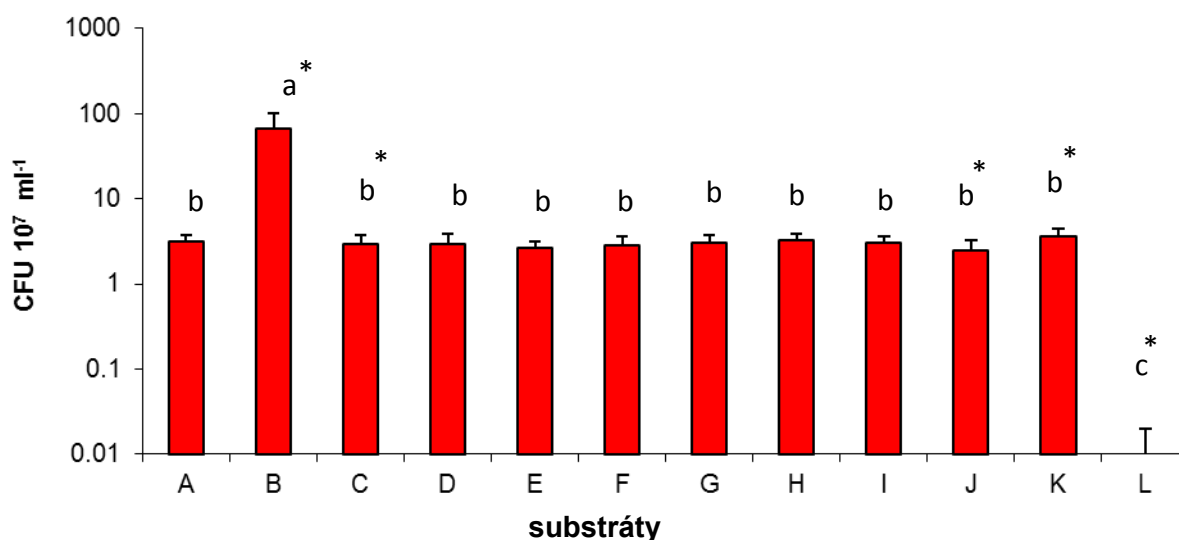
Obrázek 6. Sloupkový graf průměrných hodnot a SEM (standard errors of mean) počty buněk v 1 ml. vzorku (abundance) suspenze kmene *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s různými přísadkami stanovené pomocí barvení DAPI v epifluorescenčním mikroskopu.

A = písek + GM, B= písek + GM + glukóza, C= písek + GM + 0,05% nafta, D= písek + GM + 0,1% nafta, E= písek + GM + 1% nafta, F= písek + GM + 2% nafta, G= písek + GM + 5% nafta, H= písek + GM + 0,05% toluen, I= písek + GM + 0,1% toluen, J= písek + GM + 1% toluen, K= písek + GM + 2% toluen, L= písek + GM + 5% toluen.

Statisticky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny (One way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$), sloupce označené * se statisticky významně liší od písku (t test, $p < 0.05$, data transformována, $\log n+1$)

5.2.3 Stanovení počtu jednotek tvořících kolonie (CFU)

Variant B s glukózou vyznačoval statisticky významně vyšší počet buněk, než kultury narostlé na ostatních substrátech ty se statisticky významně nelišili s výjimkou 5% toluenu. Ve směsi L s přísadkou toluenu 5% nám buňky nerostly, kromě jednoho opakování kdy byla izolována jedna buňka. Ale na rozdíl od L substrátu jsme ve směsi K s přísadkou 2 % toluenu dostali dobré výsledky: napočítali jsme větší množství jednotlivých izolovaných kolonií buněk, což vypovídalo vysoké aktivitě spor. Minimální nárůst byl pozorován ve variantu J s přísadkou 1 % toluenu.(Obr.7)



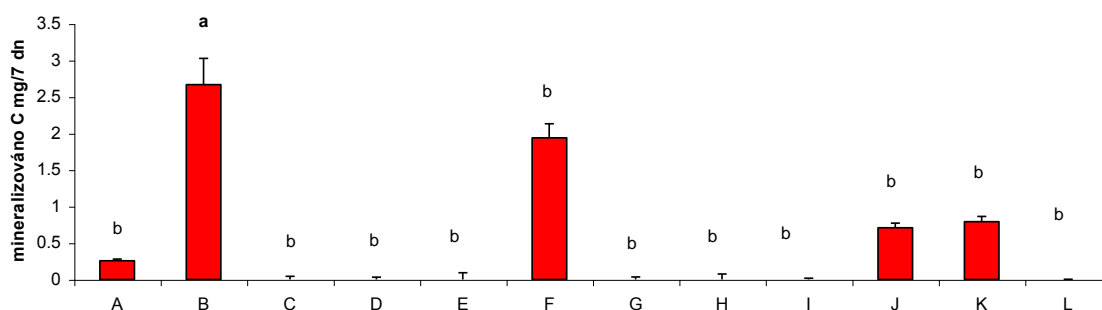
Obrázek 7. Počet CFU v 1 ml suspenzi kmene *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s různými přísadkami.

A = písek + GM, B= písek + GM + glukóza, C= písek + GM + 0,05% nafta, D= písek + GM + 0,1% nafta, E= písek + GM + 1% nafta, F= písek + GM + 2% nafta, G= písek + GM + 5% nafta, H= písek + GM + 0,05% toluen, I= písek + GM + 0,1% toluen, J= písek + GM + 1% toluen, K= písek + GM + 2% toluen, L= písek + GM + 5% toluen.

Statisticky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny (One-way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$), sloupce označené * se statisticky významně liší od písku (t test, $p < 0.05$, data transhormována, $\log n+1$)

5.2.4 Respirační testy, zjišťování mineralizace

Po 7 dnech stanovení titračních hodnot v sérii s inokulou kmene *Streptomyces sp. MIO9-2006* (*S. platensis* group) byly zjištěny nízké hodnoty respirace v některých substrátech, což poukazují na nízkou aktivitu buněk. Ve variantu G a L byla mineralizace nejnižší - jedná se o substráty s 5% nafty a toluenu. V případě substrátu B a F byla respirace nejvyšší. (Obr.8)



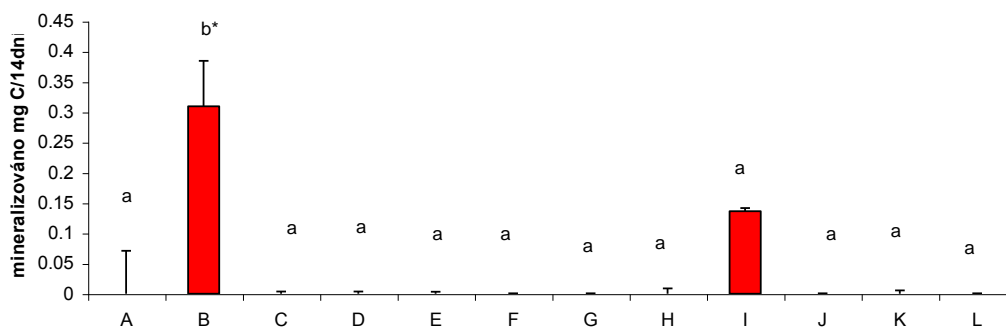
Obrázek 8. Sloupcový graf průměrných hodnot a SEM (standard errors of mean) výsledku provedené první titrace po 7 dnech v sérii s inokula kmene *Streptomyces sp. MIO9-2006* (*S. platensis* group) pěstovaného na minerálním médiu s různými přísadkami.

A = písek + GM, B= písek + GM + glukóza, C= písek + GM + 0,05% nafta, D= písek + GM + 0,1% nafta, E= písek + GM + 1% nafta, F= písek + GM + 2% nafta, G= písek + GM + 5% nafta, H= písek + GM + 0,05% toluen, I= písek + GM + 0,1% toluen, J= písek + GM + 1% toluen, K= písek + GM + 2% toluen, L= písek + GM + 5% toluen.

Statisticky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny (One-way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$), sloupce označené * se statisticky významně liší od písku (t test, $p < 0.05$, data transhormována, $\log n+1$)

Nicméně, zvýšení doby procesu do 14 dní je příznivým příkladem pro efektivní biodegradace nafty a toluenu jako jediného zdroje uhlíku a energie při teplotě 28°C, výjimečně pro směs I.

Výchozí výsledky experimentu nám potvrzují, že ve všech testovaných substrátech za dobu experimentu proces destrukce ropných uhlovodíků probíhalo s různou intenzitou. (Obr.9)



Obrázek 9. Sloupkový graf průměrných hodnot a SEM (standard errors of mean) výsledku druhé titrace po 14 dnech v sérii s kmene *Streptomyces* sp. MIO9-2006 (*S. platensis* group) pěstovaným na minerálním médiu s různými přísadkami.

A = písek + GM, B= písek + GM + glukóza, C= písek + GM + 0,05% nafta, D= písek + GM + 0,1% nafta, E= písek + GM + 1% nafta, F= písek + GM + 2% nafta, G= písek + GM + 5% nafta, H= písek + GM + 0,05% toluen, I= písek + GM + 0,1% toluen, J= písek + GM + 1% toluen, K= písek + GM + 2% toluen, L= písek + GM + 5% toluen.

*Statisticky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny (One-way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$), sloupce označené * se statisticky významně liší od písku (t test, $p < 0.05$, data transhormována, log $n+1$)*

Kapitola 6

Diskuze

Naše výsledky ukazují, že některé mikroorganismy hlubokého podloží mohou využít fosilní organické hmoty jako jediný zdroj uhlíku. To je v souladu s předchozími zjištěními prací o činnosti mikrobiálního rozkladu hlubokého podpovrchového sedimentu (Kieft a Rosacker, 1991, Frouz a kol., 2011). Z výsledků zmíněné studie (Frouz a kol., 2011), a z výsledků našeho experimentu můžeme usuzovat, že benzen a toluen, stejně jako kerogen představují velmi odolné organické sloučeniny a důkazy o jejich mikrobiální degradaci jsou vzácné.

Je zajímavé, že mikrobiální kmeny, které vykazovali schopnost využít ropu i toluen, vykapovali zároveň dobrou schopnost rozkládat fosilní kerogen (Frouz a kol., 2011).

Nicméně metabolická aktivita námi sledovaných kmenů je pomalá a nedostačující pro technologické použití. Kmeny běžně používané v biotechnologických aplikacích (Felber a Bartl, (1994)., Dyadechko a kol., (1989)., Marchenko a kol., (2004)) rozkládají, podle patentní dokumentace, naftu v procentním podílu do 90%. V patentové práci Felber a Bartl, (1994) bylo použita směs mikroorganismů, obsahující *Pseudonás Putida* a *Geotrichum candidum* při teplotě 15 až 35°C. Použití kmene *Pseudomonas Putida* také bylo vyskoušeno v nálezkové práci Dyadechko a kol., (1989) v kterém byl použit kmen v obsahu $1.8 \cdot 10^{10}$ až $3.6 \cdot 10^{12}$ živých buněk na 1 g suché biomasy. V nález Marchenko a kol., (2004) bylo použito koncentrace inokula kmene *Pseudomonas alcaligenes mev* $1 \cdot 10^7$ při teplotě 30°C s využitím jediného zdroje ropy a nafty. Konečným výsledkem bylo zaznamenáno, že došlo k mineralizaci ropy do 72%, nafty na 94,3 %. V našich experimentech došlo celkově k mineralizaci řádově mg substrátu za celou dobu pokusu což představuje významný podíl pouze u malých přísad sledovaných látek.

Navíc naše pokusy ukazují, že při dlouhodobější, třítydenní respiraci se respirace postupně snižuje to ukazuje na to, že mikroflóra může vyučívát zejména u nafty, která je směsí látek, snáze dostupné a snáze rozložitelné složky a po jejich vyčerpání dekomposice klesá.

Dalším problém, který znemožňuje technologické využití zkoumaných kmenů je fakt, že jejich růst přežívání i biologická aktivita jsou často nízké při vysokých koncentracích nafty nebo toluenů. Například, v patentové práci Marchenko a kol., (2004) bylo za použití $1 \cdot 10^7$ koncentrace inokula kmene *Pseudomonas alcaligenes mev* při teplotě 20°C došlo k degradaci nafty na 81,3%. V jiné publikace Liu P.G. a kol., (2011) bylo použito různé bakteriální kmeny o koncentraci $1 \cdot 10^8$ při teplotě 30°C, ve kterém došlo k rozkladu ropných látek větší než 60%.

Rozklad je tedy pomalý navíc omezený na malý rozsah koncentrací. Při koncentraci 0,05% nafty mycelia nerostla téměř vůbec, pravděpodobně z důvodu nedostatku zdroje organického uhlíku. Podobně na koncentraci 5% toluenu mycelia nerostla, nespíš kvůli inhibici toxickou látkou.

Celkově je metabolická aktivita sledovaných kmenů mikroflóry blízká metabolické aktivitě celého hlubinného společenstva na komplexním substrátu (Kieft a Rosacker, 1991, Frouz a kol., 2011). Pomalý metabolismus se zdá být charakteristický pro hlubinnou mikroflóru a může souviset s využíváním hůře rozložitelných zdrojů uhlíku, ale i s omezeností jiných zdrojů.

Zde je třeba podotknout, že celý pokus byl proveden za teploty 28°C, podobně jako většina vědeckých článků, které prováděly experimenty za laboratorní či vyšší teploty (20-30 °C). (Mukherji a kol., 2004, Das a Mukherjee, 2007, Vieira a kol., 2007, Prince a kol., 2008). V práci Filler a kol. (2006) uvědomují, že degradační efektivita bakteriálních kmenů stoupá se zvyšující teplotou. Proto nemůžeme říct, že naše výsledky budou fungovat stejně v půdním prostředí.

Ve srovnání se substrátem s přídavkem 5 % toluenu (L) byl na substrátu G s přídavkem 5 % nafty zaznamenán velký podíl počtu jednotlivých izolovaných kolonií buněk. Významný rozdíl růstu na substrátech nafty a toluenu podle mě závisí na chemické struktuře organické uhlovodíkové sloučeniny. Toluén je aromatickou látkou, má ve svojí struktuře jeden methylový substituent na rozdíl od nafty, která se sestává směsí organických látek, v nichž převažují jednoduché uhlovodíky různé délky.

Studium dekompozice ropy ukazuje, že obecně jsou aromatické komponenty ropy hůře rozložitelné a užitkovatelné mikroorganismy než komponenty alifatické (Das, Chandran, 2011).

Methylový substituent a benzenové jádro v molekule toluenu brání mikroorganismům v rozkladu organického uhlovodíku. V případě nafty mají mikroorganismy přístup ze všech stran, proto se zde rozklad uskutečnil, dokonce máme izolované buňky, které rostly v průběhu experimentu na naftě jako svém jediném zdroji uhlíku. Dalším možným vysvětlením rozdílů těchto výsledků pokusu může být fakt, že nafta je směsí různých organických látek, zatímco toluen je čistou látkou bez příměsí. Navíc, podle toxicity organických sloučenin je nafta méně toxická než toluen. Proto ve směsi s přídavkem 5 % toluenu už působí směs inhibičně.

Kapitola 7

Závěry

Na základě výše uvedené diskuze vyzdvihují tyto body:

- Mikrobiální kmeny hlubinné mikroflóry jsou schopny rozkládat naftu a toluen a růst na těchto médiích jako na jediném zdroji uhlíku
- Kmeny vykazující tuto schopnost jsou zároveň schopny rozkládat fosilní kerogen
- Utilizace nafty jako zástupce alifatických látek je lepší než utilizace toluenu jako zástupce aromatických látek
- Metabolická aktivita sledovaných kmenů je příliš pomalá pro použití v biodegradační praxi, ale hodí se na bioremediace odpadu.
- Z penza vědeckých článků týkajících se tématu lze soudit, že bioremediace mikroorganismy představuje změnu v budoucnosti rekultivace (Kalin R.M., 2004)
- Z ekonomického hlediska představuje bioremediace nenáročné řešení, pro optimalizaci kmenu existuje řada kultivačních médií a přísad pro uskutečnění degradace.
- Potencál bakteriální degradace toxikálií spočívá ve využití heterogenních konsorcií, která lépe pokryjí latkovou heterogenitu ropných látek

Přehled literatury

- Atlas R.M., (1981) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. Microbiological reviews 45(1): 180-209
- Atlas R.M. (1995) Bioremediation of Petroleum Pollutants. Int. Biodeterio. Biodegrad. 35: 317-327.
- Bachofen R., Ferloni P., Flynn I. (1998) Microorganisms in the subsurface, Microbiol. Res. 153: 1-22
- Bento F.M., Camargo F.A., Okeke B.C., Frankenberger W.T. (2005) Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology 96: 1049-1055
- Bloem J. 1995. Fluorescent staining of microbes for total counts. In: Akkermans A.D.L., Elsas J.D. and Bruijn F.J. (eds), Molecular Microbial Ecology Manual, Kluwer Academic Press, Dordrecht, Netherlands, p. 1–12
- Borneman J., Skroch P. W., Osullivan K. M., Palus J. A., Rumjanek N. G., Jansen J. L., Nienhuis J., Triplett E. W (1996) Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1935-1943.
- Braddock J.F., Walworth J.L, McCarthy K.A. (1999) Biodegradation of aliphatic vs. aromatic hydrocarbons in fertilized arctic soils. Bioremediation J. 3: 105-116.
- Boopathy R. (2004) Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: a soil column study. Bioresource Technology 94: 143–51
- Boivin-jahns V., Ruimy R., Bianchi A., Daumas S., Christen R. (1996) Bacterial Diversity in a Deep-Subsurface Clay Environment. Applied and environmental mikrobiology 62(9):3405–3412
- Chroňáková A., Křišťůfek V., Tichý M., Elhottová D., (2010) Biodiversity of streptomycetes isolated from successional sequences on brown coal colliery substrates

and their evidence in Miocene lacustrine sediment. *Microbiological Research* 165 (7): 594-608

Cílek V., Kašík M., (2007) *Nejistý plamen, I. vydání, Průvodce ropným světem*. Praha: Dokořán.

Cohen Y., (2002) Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int Microbiol* 5: 189-193

Derek R. Lovley, Francis H. Chapelle (1995) Deep Subsurface microbial processes. *Reviews of Geophysics* 33 (3): 365-381

Das K. a Mukherjee A. (2007) Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology* 98: 1339–1345.

Das N., Chandran P. (2011) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview, review article. *Biotechnology Research International* 2011:1-13

Dyadechko V.N., Nesterov I.I., Tolstokorova L.E., Platonova S.V. (1989) Bacterial composition and method for recovery of oil-polluted water and soil. United States Patent, USA. Patent number 4,822,490.

Elhottová D., Křistůfek V., Frouz J., Novakova A., Chronakova A., (2006) Screening for microbial markers in Miocene sediment exposed during open-cast brown coal mining, *Antonie van Leeuwenhoek* 89: 459-463

Ellis R.J., Morgan P., Weightman A. J., Fry J.C. (2003) Cultivation-dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3223-3230.

Filler D.M., Snape I., Reynolds C.M., Barnes D.L., Williams P.J., Daugulis A.J. (2006) Advances in engineered remediation for use in the Arctic and Antarctica. *Polar Record* 42: 111–120

Farhadian M., Vachelard Cedric, Duchez D., Larroche C. (2008) In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology* 99 (13): 5296-5308

Fingerman M., Nagabhushanam R. (2005) Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystems. Enfield, UK: Science Publishers, Inc.

Felber J. a Bartl N., (1994) Směs mikroorganismů. Schopných biodegradace uhlovodíků a způsob biodegradace uhlovodíků. Patentový spis, Úřad průmyslového vlastnictví, Česká Republika, číslo dokumentů patenka CZ 279021 B6.

- Frankovská J., Slaninka I., Kordík J. a kol. (2010) *Atlas sanačních metod environmentálních zátěží*. Štátní geologický ústav Dionýza Štúra Bratislava.
- Frouz J., Cajthaml T., Kříbek B., Schaeffer P., Bartuška M., Galertová R., Rojík P., Křišťufek V. (2011) Deep, subsurface microflora after excavation respiration and biomass and its potential role in degradation of fossil organic matter. *Folia Microbiol.* 56: 389–396
- Gonzalez G., Herrera M.G., Garcia M.T., Pena M.M. (2001) Biodegradation of phenol in a continuous process: comparative study of stirred tank and fluidized- bed bioreactors. *Bioresour. Technol.* 76: 245-251.
- Gogoi B.K., Dutta N.N., Goswami P., Krishna Mohan T.R. (2003) A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Advances in Environmental research* 7: 762–782
- Gu Ji-Dong (2003) Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52: 69-91
- Hart S. (1996) In-situ bioremediation-defining the limits. *Environ. Sci. Technol.* 30: 398-401.
- Horáková D. (2006) *Bioremediace*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
- Hunkeler D., Höhener P., Zeyer J. (2002) Engineered and subsequent intrinsic in situ bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology* 59: 231–245.
- Hunkeler D., Hohener P., Bernasconi S., Zeyer J. (1999) Engineered in situ bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer: assessment of mineralization based on alkalinity, inorganic carbon and stable carbon isotope balances. *Journal of Contaminant Hydrology* 37 (3-4): 201-223
- Kalin R.M. (2004) Engineered passive bioreactive barriers: risk-managing the legacy of industrial soil and groundwater pollution. *Current Opinion in Microbiology* 7: 227–238.
- Kieft T.L., Rosacker L.L (1991) Application of respiration based and adenylate based soil microbiological assays to deep subsurface terrestrial sediment. *Soil Biol Biochem* 23: 563–568
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA

Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 716–721.

Li G., Huang W., Lerner D. N., Zhang X (2000) Enrichment of degrading microbial and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Res.* 34: 3845-3853.

Lee R. a Krumholz (2000) Microbial communities in the deep subsurface, *Hydrogeology Journal* 8: 4–10

Liu C.Y., Speitel G.E., Georgiou Jr., and G. (2001) Kinetics of mehtyl t-butyl ether cometabolism at low concentrations by pure cultures of butane-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2197-2201.

Liu P.G., Chang T.C., Whang L.M., Kao C.H., Pan P.T., Cheng S.S. (2011) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65: 1119-1127.

Lloydjones G, a Lau P. C. K. (1998) A molecular view of microbial diversity in a dynamic landfill in Quebec. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 219-226.

Marchenko A.I., Vorobyov A.V., Dyadishchev N.R., Rybalkin S.P., Blokhin V.A., Marchenko S.A. (2004) Strain of *Pseudomonas alcaligenes mev* bacteria used for decontamination of soils, ground and surface waters from oil and oil products. Russian Federation. Patent No. 2228953.

Marchenko A.I., Vorobyov A.V., Borovick R.V., Aldobayev V.N., Zharikov G.A., Kapranov V.V. (2004) Strain of *Pseudomonas stutzeri* MEV-S1 bacteria, used for decontamination of soils, ground and surface waters from oil and oil products. Russian Federation. Patent No. 2228952

Machín-Ramírez C., Okoh A.I., Morales D., Mayolo-Delosia K., Quintero R., Trejo-Hernández M.R. (2008) Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. *Chemosphere* 70: 737–744.

Morrison R.D., (2000) *Environmental Forensics: Principle and Application*. Robert Morrison & Associates, San Marcos, California, USA. 384p.

Mukherji S., Jagadevan S., Vijay A., Mohapatra G., (2004) Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field. *Bioresource Technology* 95: 281–286

- Meyer S., Moser R., Neef A., Stahl U., Kampfer P. (1999). Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiol.* 145: 1731-1741.
- National Academy of Sciences (1985) *Oil in the Sea, Inputs, Fates, and Effects*. National Academy Press, Washington, DC.
- NRC (National Research Council). (2003) *Oil in the sea III: Inputs, fates, and effects*. Washington, D.C.: The National Academia Press.
- Ou L.T., Thomas J.E., Chung K. T., Ogram A.V. (2001) Degradation of 1,3-dichloropropane by a soil bacterial consortium and *Rhodococcus* sp. AS2C isolated from the consortium. *Biodegradation*. 12: 39-47.
- Petsch S.T, Eglinton T.I, Edwards K.J (2001) 14C-dead living biomass: evidence for microbial assimilation of ancient organic carbon during shale weathering. *Science* 292: 1127
- Prince R.C., Haitmanek C., Lee C.C. (2008) The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. *Chemosphere* 71: 1446–1451.
- Pelz O., Tesar M., Wittich R.M., Moore E.R.B., Timmis K.N., Abraham W.R. (1999) Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: unraveling the network of carbon sharing in a pollutant-degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry. *Environ. Microbiol.* 1:167-174.
- Raeid M., Abed M., Nimer M., Safi D., Köster J., Beer D., El-Nahhal Y., Rullkötter J., Garcia-Pichel F (2002) Microbial Diversity of a Heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of Petroleum Compounds. *Applied and environmental mikrobiology* 68 (4): 1674–1683
- Riis V., Kleinstaub S., Babel W (2003) Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia. *Can. J. Microbiol.* 49: 713-721.
- Shah A.A, Hasan F., Hameed A., Ahmed S. (2008) Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 26(3): 246-65
- Stackebrandt E., Liesack W, Goebel B (1993) Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J.* 7: 232-236.
- Vieira P.A., Vieira R.B., F.P. de França, Cardoso V.L. (2007). Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials* 140: 52–59.
- Wang Z., Brown C. (2008) Chemical Fingerprinting of Petroleum Hydrocarbons. *Methods in Environmental Forensics*. 386 p. CRC Press. Editor: S.M. Mudge. 43–107.

Whiteley A.S., Bailey M. J (2000) Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2400-2407.

Wolfgang D., Feidieker D., Steiof M., M.Becker P., Kampfer P. (1995) Comparison of ex situ and in situ techniques for bioremediation of hydrocarbon-polluted soils. *International Biodeterioration and Bioremediation* 35 (1-3): 301-316.

Wolicka D., Suszek A., Borkowski A., Bielecka A. (2009) Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology* 100 (13): 3221-3227

Internetové zdroje

EzTaxon-e server. Elektronický zdroj: <http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>

ITOPF. (2012). Statistics. Elektronický zdroj. <http://www.itopf.com/information-services/data-and-statistics/statistics/>

Herber, V., Moře a člověk, *Geografie světového oceánu*, Institut geografie, fakulta of science Masarykovy Univerzity, Brno, Česká Republika. Elektronický zdroj. http://www.herber.webz.cz/www_ocean/12-znecistení.html

Mikeš Jiří., Bioremediace kontaminací způsobených ropnými uhlovodíky. Elektronický zdroj: www.epssro.cz

Polochová, I., (2010). *OBRAZEM: Do Mexického zálivu vytekly miliony litrů ropy. Katastrofa pokračuje.* iDnes.cz, 10. května 2010. Elektronický zdroj. http://zpravy.idnes.cz/obrazem-do-mexickeho-zalivu-vytekly-miliony-litru-ropy-katastrofa-pokracuje-1xl-/zahranicni.aspx?c=A100510_162428_vedatech_ip1